

2009 12018 A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

種々の $\gamma$ 線放出核を用いた早期疾患診断プローブ開発とコンプトンカメラによる

複数核種同時イメージングに関する研究

(H19-ナノ一般-018)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 秀一

平成22(2010)年5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

種々の $\gamma$ 線放出核を用いた早期疾患診断プローブ開発とコンプトンカメラによる

複数核種同時イメージングに関する研究

(H19-ナノ一般-018)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 秀一

平成22(2010)年5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

種々の $\gamma$ 線放出核を用いた早期疾患診断プローブ開発とコンプトンカメラによる複数核種同時イメージングに関する研究-----	1
榎本 秀一	

### II. 分担研究報告

1. 糖尿病初期診断の新規プローブ探索および合成と、PETまたはGREI装置を用いたイメージングに関する研究-----	15
片岡洋祐	

2. Si/CdTeコンプトンカメラによる複数分子同時イメージングの臨床応用開発に向けた小動物等の撮像実験-----	19
高橋忠幸	

3. Si/Geおよびアレイ型コンプトンカメラによる複数分子同時イメージング装置の撮像性能向上に関する研究-----	22
本村信治	

4. Geコンプトンカメラによる複数分子同時イメージング法の検証と臨床応用に向けた要素技術開発に関する研究-----	25
金山洋介	

5. 複数分子同時 $\gamma$ 線イメージング装置に利用可能な新規核医学核種の探索とRI製造に関する研究-----	29
羽場宏光	

6. 腫瘍を標的とした高精度核医学プローブの開発に関する研究-----	34
北村陽二	

7. DOTA-D-Phe-D-Phe-octreotideの早期糖尿病診断薬としての可能性に関する研究-----	55
御船正樹	

8. Si/CdTe検出器の改良と臨床用装置の開発に関する研究-----	76
三戸美生	

9. リチウムドリフト型シリコン検出器の開発に関する研究-----	77
鈴木孝宏	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	78
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	82
----------------------	----

V. NEDO成果報告書 (参考)	
半導体コンプトンカメラによる複数分子同時イメージング機器の開発に係わる先導研究-----	189

種々の $\gamma$ 線放出核を用いた早期疾患診断プローブ開発とコンプトンカメラによる

複数核種同時イメージングに関する研究

研究代表者・榎本 秀一 独立行政法人理化学研究所・神戸研究所・分子イメージング科学研究センター・

複数分子イメージング研究チーム チームリーダー

研究要旨：分子イメージング研究の推進により、迅速な生体内における生物学的反応過程画像化が可能になってきた。核医学撮像モダリティは、標的に対して特異性を持つ分子プローブをRI標識することによってイメージングがなされる。この場合、通常一度に撮像可能なRI標識分子プローブは一種類だけである。生体内における反応過程は様々な複合的反応である。このため、単一分子プローブでは病態を特徴付けるのに不十分である。我々は、がん、炎症および糖尿病早期診断に資する新規分子プローブ創薬研究を推進している。複数因子が複合的に関与している生命現象や疾患は多様であり、複数の分子プローブを同時に用いることで、より高度で正確な多元的診断や治療が可能であることは論を待たない。

本年度は、この装置を用いて、がんと炎症特異的診断薬、糖尿病早期診断薬などを探索し、正常および病態モデルマウスに複数の異なる放射性核種でラベルした化合物、既存放射性医薬品を同時投与した複数分子同時リアルタイム代謝イメージングを推進した。また、新プローブの開発には、既存モダリティPETとの比較や臨床装置開発に向けての現有装置の改良点を洗い出し、装置改良と画像の高精度化を行った。

具体的には、糖尿病発症に関わる新規バイオマーカー探索において、GREIによる肥満・糖尿病モデル動物の微量元素イメージングとバイオインフォマティクスを駆使した新規マーカー分子の探索を行った。まず、糖尿病において、血糖値の上昇に先行して膵 $\beta$ 細胞数が減少することに着目し、膵 $\beta$ 細胞数の減少を検出することで、糖尿病の早期診断を可能とする分子イメージングプローブを開発した。これはoctreotideを母体化合物として、そのN末アミノ酸を置換した誘導体を設計・合成し、その体内動態を検討した。さらに、この類縁化合物をがん検出プローブとしても応用するため、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe $^1$ -octreotideのN末アミノ酸への負電荷の導入により、腎集積を低減した精度の高い診断、治療を可能とする優れた核医学プローブの開発に成功した。

一方、Si検出器とCdTe検出器を組み合わせた半導体コンプトンカメラを用い、同様に小動物を用いた複数分子同時イメージングも推進し、さらにGREIにSi検出器を付加することを実現した。これにより、SPECT核種とPET核種の同時測定に成功した。また、Si/Geおよびアレイ型コンプトンカメラによる、撮像性能の向上について検討し、ドップラーブロードニングの影響の効率的な補正法を完成した。さらに2台のGREIで構築されたアレイ型コンプトンカメラによる撮像実験で、撮像視野を拡大した高精度の3次元断層撮像を実現した。

分担研究者

片岡洋祐	(独) 理化学研究所分子イメージング科学研究センター・細胞機能イメージング研究チーム・チームリーダー
高橋忠幸	(独) 宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究研究所・教授
本村信治	(独) 理化学研究所・分子イメージング科学研究センター・複数分子イメージング研究チーム・研究員
金山洋介	(独) 理化学研究所・分子イメージング科学研究センター・複数分子イメージング研究チーム・研究員
羽場宏光	(独) 理化学研究所・仁科加速器研究センター・森田超重元素研究室・専任研究員
北村陽二	金沢大学学際科学実験センター・准教授
御船正樹	岡山大学大学院・准教授
三戸美生	(株) アクロラド・開発部長
鈴木孝宏	キャンベラジャパン (株)

A. 研究目的

本研究は、複数分子同時イメージングに資する新核医学核種の合成とこれを用いた新プローブの創薬を行い、かつ、それらのプローブを用いた生体分子動態の低・非侵襲的（非破壊）な可視化を行うことを目的とする。具体的には、実験動物を用いた基礎医学的研究によって、癌、脳神経疾患、生活習慣病（糖尿病など）の早期診断、移植や再生医療の臨床経過観察の指標となる新プローブ候補物質を創薬する。併せて、新たなモダリティとしてコンプトンカメラの臨床用装置の基礎医学的検証も行う。また、複数分子同時イメージングに用いるイメージング装置は、開発済プロトタイプコンプトンカメラ（Ge、Si/CdTe、Si/Ge）を用い、臨床特化する改良のための技術開発を NEDO マッチングファンドにより推進

する。

現在、分子イメージング研究に関する社会的期待が高まり、生体分子の体内動態の非侵襲的（非破壊）な可視化技術の実用的高度化のニーズがあり、本事業による複数分子同時イメージングの実現により、分子イメージング研究において、以下のようなブレークスルーを期待できる。

- 1) 高特異性標識：我々の開発中または開発済みのコンプトンカメラは、これまで PET、SPECT に用いられてきた核種すべてを含む、広域エネルギー（数十～2500keV）・線放出核を計測することができるため、核種選択の幅が広がり、特異性の高い標識プローブなどの創薬が可能で、合成の制約も小さくなる。
  - 2) 低干渉・高透過性標識：コンプトンカメラの信号源は・線放出核であり、生理学的な干渉が少ない標識化合物や、高透過性、高吸収性の標識化合物を任意に選択することができる。
  - 3) 長期反復計測：コンプトンカメラは広域エネルギー・線を計測できるため、計測対象となる過程の特定数に応じて選択できる。また、中長期間にわたる物質動態を同一個体で反復計測できる。
  - 4) 複数分子同時計測：コンプトンカメラは、エネルギー分解能の高い Ge 半導体、Si 半導体および CdTe 半導体を組み合わせた Si/Ge、Si/CdTe を用いることにより、複数の・線放出核種を同時に並行計測することができる。
  - 5) 高感度・高解像度計測（低被ばく化の実現）：コンプトンカメラは、コリメータを使用しないため感度が高く、検出器部分に半導体を使用し、その検出器内相互作用位置計測技術を用いるため解像度が高い。PET・SPECT 核種を含む多様な放射性医薬品が使用可能でありながら、高感度である。また、既存モダリティより少ない RI 量で多くの情報を得ることができるため、計測にともなう被ばくを低減できる。
  - 6) 定量計測：コンプトンカメラは、透過性が高く、吸収や散乱の影響の小さい中・高エネルギー・線を計測でき、画像再構成に期待値最大化最尤推定法などの方法を用いるため、吸収や散乱の影響をさらに減弱し、SPECT よりも高度に定量的な計測ができる。この事業の推進により、複数分子同時・線が計測可能となることから、これまでになかった装置（コンプトンカメラ）とプローブ（金属錯体、生体分子など）を用いた新規診断・治療法開発、すなわち、エレクトロニクス、情報技術、材料科学、ライフサイエンスの諸分野を融合した産業の展開が期待できる。具体的な波及効果として、新規診断・治療法開発・創薬による、QOL 向上・医療費削減などがもたらされる。厚生労働行政の観点から、本研究に期待される効果の具体例として、以下のものが挙げられる。
- 1) 治療法のモニタリング技術開発により、遺伝子治療、移植・再生医療、新機能性材料を用いた

治療などの次世代医療が実現し、がん、糖尿病などの早期発見に資する診断法が確立できる。また、再生医療や移植医療の成功率の定量的評価などが簡便に行える環境ができ、国民の QOL が向上する。同時に、診断・治療法開発技術や標識生体分子、標識金属錯体化合物などを用いた新規創薬の効率化がはかられ、医療費が削減される。

- 2) 代謝過程の相互作用の解明による、バイオインフォマティクスの高度化により、診断・治療法開発や新規創薬の一部を、高度化されたバイオインフォマティクス技術によって可能となり、開発期間が短縮され、医療費が削減、実験廃棄物による環境汚染リスクなども軽減される。またテーラーメイドも含めた予防医学が進歩する。
- 3) 検出器、回路設計、画像再構成アルゴリズム設計ノウハウの蓄積によるデータマイニング技術の高度化により、計算機支援設計技術が高度化され、医療機器などの開発費が削減される。

以上のようなさまざまな利点を有する複数分子同時イメージングを実現する新規モダリティの創出と新核医学プローブの創薬を推進することをこの事業の目的としている。

## B. 研究方法

本事業においては、我々の開発してきた基盤技術を集約して、複数分子同時イメージングが可能な新規モダリティの創出とそのための新規放射性医薬品の創薬を行うが、既存の基盤技術と本事業への具体的アプローチは以下のような構成になる。

- 1) 大型加速器（理研リングサイクロトロン、AVF サイクロトロン、RI ビームファクトリー）による有用全元素 RI 製造 ⇒ 新核医学核種の創出、効率的製法の確立（マルチトレーサー法（特許）、シングルトレーサー製造、自動化学分離法はすでに確立済、RI ビームファクトリーによる RI 製造法を開発（特許））
- 2) 有用新核医学核種のスクリーニング ⇒ 物理学的半減期や製造法（ジェネレーター供給の検討）、国内外の輸送も考慮した供給体制の検討
- 3) 有用新核医学核種による新プローブの創薬 ⇒ 既存核医学用製剤の錯体化合物の利用、既存医薬品（主として金属錯体化合物）の利用、生体分子の標識化、それらを用いた動物実験での実証（新モダリティ Ge（特許）、Si/CdTe（特許）および Si/Ge（特許）などのコンプトンカメラと既存 PET、SPECT、MRI、分光学的手法などとの比較検証を含む。
- 4) 動物実験検証による新モダリティ創出（NEDO）へのフィードバックと改良、臨床装置の開発への寄与 ⇒ Ge、Si/CdTe および Si/Ge の

臨床装置（すべて新特許出願予定）への特化と基礎医学実験による検証

本事業の平成 21 年度研究計画とその方法、分担体制を以下に示す。

### I. 新核医学核種の探索と新プローブの創薬

- 1) 核種製造技術の確立と多核種同時イメージングに資する新核医学核種の探索
- 2) ニーズに合わせた新プローブ（標識化合物）の探索と合成
- 3) 2)の新プローブによる GREI を用いた多核種同時イメージング
- 4) 実用化のための基礎医学研究と他のモダリティとの比較研究

### II. 装置開発と検証

- 1) Ge コンプトンカメラ (GREI) による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗い出し
- 2) GREI の改良
- 3) Si/CdTe コンプトンカメラ（現有）による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗い出し
- 4) Si/CdTe コンプトンカメラの改良  
(倫理面への配慮)

本提案は、ラット、マウスなどの実験動物を主に使用する。また、一部ヒト由来試や細胞などを用いた研究や臨床研究も含まれる。研究の遂行に当たっては、(独) 理化学研究所・臨床および動物実験実施に関する諸規定に従い、実験計画を申請し、承認後に実験を遂行している。

### C. 研究結果

#### I. 新核医学核種の探索と新プローブの創薬

- 1) 核種製造技術の確立と多核種同時イメージングに資する新核医学核種の探索
- 2) ニーズに合わせた新プローブ（標識化合物）の探索と合成
- 3) 2)の新プローブによる GREI を用いた多核種同時イメージング
- 4) 実用化のための基礎医学研究と他のモダリティとの比較研究

(新プローブの探索と合成)

本年度は、糖尿病早期診断薬とがん診断用分子プローブの創出を目標とし、以下のプローブ開発を行った。

(糖尿病早期診断薬の開発とバイオインフォマティクスからのプローブ探索へのアプローチ)

これまでに、膵β細胞のイメージングを目指した<sup>68</sup>Ga-DOTA-ソマトスタチンの創薬開発とPETイメージングを行い、膵β細胞イメージングの実証に成功した。しかし、複数分子同時イメージング法の確立のためには、さらなる分子マーカーの探索が必要で

ある。

本年度は肥満・糖尿病状態に変化することが知られている生体内微量元素元素の変化に着目し、GREIイメージングとマルチトレーサー実験から膵臓でユニークに変化する微量元素元素を同定し、この微量元素元素の動態に関わる遺伝子を階層ベイズ法によるバイオインフォマティクスを利用して、公共データベースから候補因子の選択を行った。

具体的には、肥満・糖尿病モデルマウスを作製し、このマウスに理研・仁科加速器センターが保有する大型加速器で製造したマルチトレーサー溶液を尾静脈投与し、投与後、各組織内RI分布を高純度Ge半導体検出器により測定した。肥満・糖尿病モデル動物に、<sup>65</sup>ZnCl<sub>2</sub>、<sup>54</sup>MnCl<sub>2</sub>、<sup>85</sup>SrCl<sub>2</sub>混合溶液を尾静脈から投与し、GREIイメージングを行った。また、公共データベース (NCBI: National Center for Biotechnology Information、EMBL: European Bioinformatics Institute) で公開している、肥満・糖尿状の膵臓遺伝子発現プロファイルを用いて、階層ベイズ法による統計解析により、肥満・糖尿状態で発現変動する金属輸送遺伝子に着目したIn silicoスクリーニングを行った。マルチトレーサー実験による生体微量元素元素の時間依存的な組織分布を検討した結果、膵β細胞においてインスリン分泌や合成、細胞機能に重要なZnやMn等が、コントロールマウスで測定された時間依存的な代謝反応が、肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓組織においては見られなかった。この結果は、疾患モデルにおいて、これら金属元素の吸収や排泄等の生体反応が低下していると考えられた。この代謝反応の低下は膵臓のみならず、インスリンが標的とする肝臓や脂肪組織においても見られた。一方、このマルチトレーサー実験結果から得られたユニークな金属元素の代謝として、Srが肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓組織において測定できた。マルチトレーサー実験から得られた結果をもとに、GREIを用いてγ線放出核種である<sup>65</sup>Zn、<sup>54</sup>Mnおよび<sup>85</sup>Srの3核種を使った複数分子同時イメージングを行った。12時間の撮像実験結果から3時間毎の2D再構成画像を作製し、コントロールマウスと肥満・糖尿病モデルマウスの代謝イメージングを比較したところ、肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓周辺および心臓周辺においてのみ変化するSr代謝イメージングに成功した。また、Srの代謝反応は撮像開始6~9時間で組織における吸収が最大となり、12時間では排泄され、撮像開始後3時間のレベルと同等であるという、これまでに全く報告のない新規知見、および、先のマルチトレーサー実験を反映した結果を得た。

マルチトレーサー実験とGREIイメージング実験の結果から、Sr輸送に関わる遺伝子が糖尿病状態における膵臓イメージングを可能にする新規候補因子であることが示唆された。

一方、Srを輸送する遺伝子の探索として、階層ベイズモデル法を導入した統計解析手法を構築し、公共データベースを利用したin silicoスクリーニングを行った。階層ベイズモデル法は、実験毎のデータ、もしくはDNAアレイに使われる同一遺伝子の異なる配列を認識する複数のプローブ間等のデータ、さらに、既存のプローブが単一疾患における遺伝子発現レベルの差異に着目していたことに対して、複数疾患における複数分子の発現様式をも探索することができる手法である。この統計解析手法を用いて、肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓組織からSrを輸送すると考えられる金属輸送タンパク質を約20種類同定した。この候補遺伝子の中にはCa輸送タンパク質ファミリーであるTRPMおよびTRPVファミリーに属する遺伝子や、ATPase駆動型2価イオン輸送タンパク質等が含まれていた。

複数分子同時イメージングによる膵β細胞イメージングの新規マーカー分子探索において、生体微量金属元素の代謝過程という観点から精査したところ、Sr輸送タンパク質が新規マーカー遺伝子になることが判明した。

#### (糖尿病早期診断プローブの研究 ペプチド薬)

本研究では、上記アプローチとは別に、従来からのペプチド薬による早期糖尿病診断薬の開発を目的とし、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出可能なプローブの開発を試みた。我々の過去の研究では、DOTA-octreotideのN末アミノ酸を、ベンゼン環を持つアミノ酸であるTyrosine 2個に置換した化合物が、他のN末アミノ酸置換型DOTA-octreotide誘導体と体内動態が異なり、特に、膵臓に比較的高い集積を示すことが明らかになっている。そこで、ベンゼン環を持つアミノ酸として、Tyrosineとは脂溶性の異なるD-Phenylalanine (D-Phe) に着目し、DOTA-octreotideのN末にD-Pheを2個導入した化合物を設計し、その体内動態を検討し、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出可能な早期糖尿病診断薬としての可能性を検討した。<sup>111</sup>In-DOTA-octreotide誘導体の体内放射能分布は、D-Phe体、D-Phe-D-Phe体は、いずれの場合も投与3時間後までには血中からほとんど消失し、速やかな血液からのクリアランスを観測した。腎放射能集積をD-Phe体とD-Phe-D-Phe体とで比較すると、投与10分ではD-Phe体よりも腎集積が有意に低かったが、投与1時間以降では有意差はなかった。一方、腎以外の臓器への集積を比較すると、D-Phe-D-Phe体は、腸、胃、膵臓と肺に特異な集積が見られた。特に膵臓においては、投与初期から非常に高い放射能集積が認められた。一方、ノーマルマウスとSTZマウスにおいて、D-Phe-D-Phe体の体内放射能分布を比較すると、膵臓への集積は、STZマウスの方が増加している結果となった。

(がん診断分子イメージングプローブの開発研究抗体薬)

抗上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR) 抗体 (セツキシマブ)、抗HER2抗体 (トラスツズマブ)、抗血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) 抗体 (ベバシズマブ) のPETプローブ化を行った。

撮像対象として、BALB/c nu/nu マウスにEGFR高発現細胞株であるA431株(右肩)、HER2高発現細胞株BT474(左肩)、EGFR/HER2強発現細胞株SKOV3(右大腿部)、EGFR/HER2低発現細胞株C6(ネガティブコントロール、左大腿部)を同時移植した担がんモデルマウスを作成し使用した。腫瘍組織内におけるEGFR、HER2、VEGF発現について、蛍光組織免疫染色法及びWestern blotting法により評価した。各標識抗体投与後、24時間および48時間の時点で30分間のPET撮像を行い、各がん部位への集積を検討した。撮像後、解剖して各臓器およびがん部位中の放射能を測定した。

PETイメージングの結果、<sup>64</sup>Cu-DOTA-抗EGFR抗体のA431、SKOV3がん部位への高集積が見られたが、同時にBT474、C6がん部位への集積も認めた。また<sup>64</sup>Cu-DOTA-抗HER2抗体は各がん組織へ同等の集積が見られたが、投与後48時間の時点ではSKOV3がん部位に特に高い集積が見られた。<sup>64</sup>Cu-DOTA-抗VEGF抗体に関しては、A431、C6がん部位に集積が見られた。解剖後の放射能測定では、各がん部位、肝臓、血液中に高い放射能があり、PET結果と同様の集積が確認できた。

(がん診断分子イメージングプローブの開発研究2ペプチド薬)

OctreotideのN末端アミノ基にDTPAやDOTAを結合させ、<sup>111</sup>In、<sup>68</sup>Ga、<sup>90</sup>Y、<sup>64</sup>Cuで標識した化合物は、ソマトスタチンレセプターを発現する腫瘍に対する画像診断薬やアイソトープ治療薬剤として、欧米でその有用性が認められている。しかし、これらの化合物は腫瘍以外に、正常な腎臓へも集積するため、腎臓周辺の腫瘍への適用が困難であり、また、アイソトープ治療においては、腎集積による腎放射線障害を生じることが問題となっている。<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotideのN末アミノ酸への負電荷の導入が、腎集積の低減に有効であることを提言してきたが、今回、腎集積を低減した精度の高い診断、治療を可能とする優れたがんイメージングプローブの開発を目的として、DOTA結合octreotideについて、N末アミノ酸への負電荷の導入が及ぼす腎臓や腫瘍集積性への影響を検討した。<sup>111</sup>In-DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide (D-Phe体)、<sup>111</sup>In-DOTA-Asp<sup>1</sup>-octreotide (Asp体) 及び<sup>111</sup>In-DOTA-Asp-Asp<sup>1</sup>-octreotide (Asp-Asp体)のいずれの場合も、腎臓に

において、他の臓器に比べて高い放射能集積が観測された。腎放射能集積を D-Phe 体と Asp 体、Asp-Asp 体とで比較すると、投与 1 時間後以降において、Asp 体及び Asp-Asp 体は D-Phe 体よりも腎放射能集積が低い傾向があった。さらに、その低減の程度は、より負電荷数の多い Asp-Asp 体のほうが、Asp 体よりも大きかった。その他の臓器においては、有意差が認められるポイントはあるものの、放射能の集積量は、腎臓と比べると全体的に非常に少なかった。

D-Phe 体、及び Asp-Asp 体の担癌マウスにおける体内放射能分布は、ノーマルマウスでの結果と同様、Asp-Asp 体は D-Phe 体よりも低い腎集積を示した。また、腫瘍への集積も確認できた。

また、D-Phe 体、及び Asp-Asp 体の担癌マウスにおける  $^{68}\text{Ga}$ -PET 画像を撮像した。 $^{111}\text{In}$  標識体での体内分布実験の結果と同様に、Asp-Asp 体は D-Phe 体よりも明らかに低い腎集積を示した。D-Phe 体、及び Asp-Asp 体の担癌マウスにおける腎集積の定量解析の結果、Asp-Asp 体は D-Phe 体よりも腎集積が低減していることがわかった。

#### (新規核医学核種の探索と RI 製造)

画像診断装置の開発においては、プローブとなる新規医薬品の開発と同時に、新核医学核種探索とその標識方法の確立が必要である。現在、理化学研究所分子イメージング科学研究センターでは抗体、核酸、ペプチドなど様々な生体分子を PET イメージングプローブとする手法として、これら分子にキレーター分子 1,4,7,10-tetraazacyclo dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) を結合した後、ポジロン放出金属核種により標識する手法が採られている。昨年度までに標識に用いる核種として  $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$  ジェネレータにより容易に入手可能な  $^{68}\text{Ga}$ 、小型サイクロトロンで製造可能な  $^{64}\text{Cu}$  の製造法を確立し、プローブ化に成功してきた。半導体コンプトンカメラ GREI による複数分子同時イメージング実現のためには、これらを他のガンマ線放出核種で標識することが必要となる。そこで、本研究ではこれまでに理化学研究所で製造法が確立できた  $^{65}\text{Zn}$  と、市販されている  $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{59}\text{Fe}$  を用いたプローブ標識法の検討を行った。また、これらの他に GREI イメージングに適用可能でサイクロトロン製造の可能な核種の探索を行った。

$^{65}\text{Zn}$  及び市販の  $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{59}\text{Fe}$  を用いた標識法の検討を行った。pH2、3.5、5、6.5 と溶媒温度 40°C、95°C の条件下でそれぞれ DOTA-オクトレオチドとの反応を行い、標識率を評価した。また、サイクロトロンで製造可能かつ GREI 撮像に利用可能なガンマ線エネルギー、半減期を有する放射性核種について *in silico* スクリーニングによる探索を行った。

$^{65}\text{Zn}$  は  $^{64}\text{Cu}$  の抗体標識に用いる pH6.5、40°C の条

件下ではほとんど標識されず、温度を 95°C に上げるといずれの pH でも 90% 以上の高標識率を得ることができた。市販の  $^{54}\text{Mn}$  はいずれの条件でもほとんど標識されず、pH が高い条件下では 40°C、95°C に加熱することで不純物と思われる茶褐色の析出、沈殿が見られた。 $^{59}\text{Fe}$  も  $^{54}\text{Mn}$  同様にいずれの条件でも低い標識率であり、pH3.5 以上では茶褐色の析出、沈殿が見られた。高い比放射能にも関わらず含有する他の金属元素不純物によってほとんど標識できないことがわかった。

GREI イメージングに利用可能な新規核医学核種については、製造の実現可能性、 $\gamma$  線エネルギーなどから検討した結果、以下のものが候補として挙げられた。大型加速器と濃縮同位体を利用した核種製造が必要となるが、①臨床で使用可能な程度の短・中半減期を有する核種として  $^{52}\text{Mn}$  (半減期 5.6 日、 $^{52}\text{Cr}(p,n)^{52}\text{Mn}$  核反応などで製造可能)、 $^{63}\text{Zn}$  (半減期 38.1 分、 $^{63}\text{Cu}(p,n)^{63}\text{Zn}$ )、 $^{76}\text{Br}$  (半減期 16 時間、 $^{76}\text{Se}(p,n)^{76}\text{Br}$  など)、 $^{94}\text{Tc}$  (4.9 時間、 $^{94}\text{Mo}(p,n)^{94}\text{Tc}$ )、 $^{124}\text{I}$  (半減期 4.15 日、 $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ ) ②臨床検査に用いるには半減期が長いものの小動物実験など基礎研究に利用可能な核種として  $^{48}\text{V}$  (半減期 15.97 日、 $^{48}\text{Ti}(p,n)^{48}\text{V}$  で製造可能)、 $^{51}\text{Cr}$  (半減期 27.7 日、 $^{51}\text{V}(p,n)^{51}\text{Cr}$ )、 $^{54}\text{Mn}$  (半減期 312.2 日、 $^{54}\text{Cr}(p,n)^{54}\text{Mn}$ )、 $^{56}\text{Co}$  (半減期 77.26 日、 $^{56}\text{Fe}(p,n)^{56}\text{Co}$ )、 $^{85}\text{Sr}$  (半減期 64.9 日、 $^{85}\text{Rb}(p,n)^{85}\text{Sr}$ )、 $^{88}\text{Y}$  (半減期 106.6 日、 $^{88}\text{Sr}(p,n)^{88}\text{Y}$ )。

## II. 装置開発と検証

- 1) Ge コンプトンカメラ (GREI) による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗
- 2) GREI の改良

複数分子同時イメージングを実現する装置として、半導体コンプトンカメラ「GREI」の開発を行っているが、コンプトンカメラは機械的なコリメータを用いないガンマ線撮像装置であり、特に現在の GREI は撮像センサーとしてエネルギー分解能が高い高純度ゲルマニウム (Ge) 半導体検出器を用いているため、約 200 keV ~ 2 MeV の広いエネルギー範囲のガンマ線を精確に識別した同時撮像が可能である。そこで、それぞれの分子プローブ毎に異なるエネルギーのガンマ線を放出する RI を標識することで、複数分子同時イメージングが可能になる。

しかし、撮像するガンマ線のエネルギーが約 200 keV 以下になると、Ge 検出器内で光電吸収が起こる確率が高くなり、効率的なコンプトンイメージングを行う事は現実的ではなくなる。また、1台のコンプトンカメラでは3次元断層撮像が可能な視野が狭く、特にカメラの軸方向の空間分解能特性の低下は避けられない。本年度は、共同事業である NEDO の機器開発先導研究プロジェクトで開発中の Si/Ge およ



びアレイ型コンプトンカメラによる、複数分子同時イメージング装置としての撮像性能の向上について検討した。

Si/Geコンプトンカメラ用のSi半導体検出器としては、NEDO事業においてJAXAが常温で動作可能なSiストリップ検出器やSiパッド検出器の開発を進めてきた。これらの検出器はGe半導体検出器のような大掛かりな冷却システムが不要であり、可搬型のコンプトンカメラシステムの構築に適していると言える。本年度はこれらの検出器に加えて、リチウムドリフト型Si検出器[Si(Li)検出器]の利用について検討した。Si(Li)検出器は単結晶でも1 cm以上もの厚みを持った放射線検出器が実現可能であり、として利用可能である。また、撮像視野を拡大し、より高精度な3次元断層画像の取得を可能にするため、我々が使用している2台のGeコンプトンカメラを撮像対象の周囲に配置したアレイ型コンプトンカメラを構築した。このアレイ型コンプトンカメラシステムを用いて、2つの<sup>54</sup>Mnの球状ガンマ線源を撮像視野中心に配置し、撮像実験を行った。

Si(Li)検出器をSi/Geコンプトンカメラの撮像素子として利用可能にするためには、Geコンプトンカメラの場合と同様に、平板型のSi(Li)検出器の表裏両面の電極を互いに直交する方向のストリップ状に分割した、両面直交ストリップ電極式Si(Li)検出器とすることが考えられる。我々は、有感領域が24 mm×24 mm、厚さ3.5 mmで、表裏それぞれの電極が8本のストリップ状に分割された両面直交ストリップ電極式Si(Li)検出器を理研で準備した。この検出器を用いて、<sup>241</sup>Amから放出されるガンマ線およびX線を計測したところ、1 keV以下の優れたエネルギー分解能が得られた。

また、理研で構築したアレイ型コンプトンカメラシステムを用いて、撮像視野中心に配置した2つの<sup>54</sup>Mnの球状ガンマ線源を撮像した結果、1台のコンプトンカメラのみで撮像した画像中では分離できていなかった2つの球状のガンマ線源が、アレイ型コンプトンカメラで撮像した画像中では明確に分離した3次元画像として描出された。

### 3) Si/CdTe コンプトンカメラ（現有）による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗い出し

#### 4) Si/CdTe コンプトンカメラの改良

これまでにセンサーとしてSi及びCdTe半導体検出器を組み合わせたSi/CdTeコンプトンカメラの開発を行っており、既に宇宙γ線観測用のプロトタイプを用い、80 keVから600 keVのγ線に対するSi/CdTeコンプトンカメラによるγ線イメージングを世界に先駆けて実証することに成功している。このプロトタイプで使用されたSi及びCdTe検出器

も、微細電極形成、バンプ接合、信号処理用VLSI技術などについて分担研究者らが研究開発を重ねてきたものであり、その性能は世界最高レベルを達成している。これらの宇宙科学研究で培われた技術を応用することにより、Si/CdTeコンプトンカメラを臨床用複数分子同時イメージング装置として適用可能であることが期待される。本研究では、主に共同事業であるNEDOのプロジェクトで臨床応用開発に向けて構築されたSi/CdTeコンプトンカメラシステムを用いた小動物等の撮像実験の結果を踏まえ、臨床用撮像装置としての性能や問題点を明らかにし、実用化のための技術開発に有用な情報を得ることを目的とした。

Si/CdTeコンプトンカメラのプロトタイプを用いた小動物等の撮像実験のデータを詳しく解析し、臨床用撮像装置としての性能や問題点を検討した。単純逆投影画像のデコンボリューション法等を用いて画像を生成した。これらの結果を、理化学研究所のGeコンプトンカメラで撮像されたデータと比較した。

低エネルギーγ線の撮像に対して有用なSi半導体検出器の特性に関して詳しく検討した。これを明らかにするため、検出器の内部での応答について、半導体内部でのγ線の相互作用や、生成される電子やホールの拡散過程を考慮した計算機シミュレーションを行った。

実験データを通じて高精度化したモンテカルロシミュレーターを用いて、小動物撮像用Si/CdTeコンプトンカメラのデザインの検討を進めた。ASTRO-H衛星（2014年打ち上げ予定）に搭載するSoft Gamma-ray Detector (SGD)をベースデザインとして、検出器構成や配置の最適化を行った。

正常マウスを用いた複数核種同時イメージング実験で得られたデータを用いて画像再構成を行った結果、特に<sup>131</sup>I-Adosterolの画像は、理化学研究所のGeコンプトンカメラで撮像された画像と同様の分布を示す結果が得られた。また、γ線源を用いた撮像実験の結果、幅3 mmの空隙を描出可能であることが明らかになった。

Si半導体検出器の特性に関する詳細な検討の結果、半導体内部でのγ線の相互作用や、生成される電子やホールの拡散過程を考慮した計算機シミュレーションを行うことで、Si検出器で得られるγ線のエネルギースペクトルを精度良く再現できることが明らかになった。これにより、Si検出器の応答である検出信号の形成過程が解明され、より高度なシステムを開発するための有用な情報が得られた。

小動物撮像用Si/CdTeコンプトンカメラデザインの検討では、計4台のコンプトンカメラをリング状に配置したデザインでの装置性能を調べた。正六面体の頂点に点線源を仮定して、空間分

解能を調べたところ、3.56 mm 離れた MBq レベルの点線源を 30 分の計測時間でクリアに分解できる空間分解能が実現できることがわかった。さらに、マウスを模擬したファントム中で、周辺の正常組織への薬剤の取り込みも考慮したシミュレーションを行った。悪性腫瘍を模擬した直径 10 mm、周辺組織よりも 5 倍の取り込みをもつ領域を 30 分の計測で検出可能であることが分かった。

#### D. 考察

##### I. 新核医学核種の探索と新プローブの創薬

- 1) 核種製造技術の確立と多核種同時イメージングに資する新核医学核種の探索
- 2) ニーズに合わせた新プローブ（標識化合物）の探索と合成
- 3) 2)の新プローブによる GREI を用いた多核種同時イメージング
- 4) 実用化のための基礎医学研究と他のモダリティとの比較研究

（糖尿病早期診断薬の開発とバイオインフォマティクスからのプローブ探索へのアプローチ）

これまでに、糖尿病の膵臓組織をはじめインスリン標的末梢組織において、代謝異常により、Zn、Mn、Mg や Ca などの金属元素濃度が低下していることが知られている。逆に、肥満・糖尿病状態で変化するユニークな金属元素を同定できれば、それを調節する遺伝子を同定することで、疾患診断に有用な特徴的マーカー分子が発見できる考えられる。本研究は、上記着眼点のもと行い、肥満・糖尿病状態の膵臓組織および心臓において、Sr の代謝に関わる遺伝子が発現していることを示唆する結果を得た。この遺伝子の探索として、階層ベイズモデル法による統計解析から *in silico* スクリーニングを行い、約 20 種類の金属輸送タンパク質をコードする遺伝子を同定した。この中には Ca 輸送タンパク質である TRPM や TRPV ファミリーに属する遺伝子が含まれていた。ファミリー遺伝子はアミノ酸配列の相同性から分類されており、未だ機能未知な遺伝子も存在している。Sr は元素周期表上、Ca と同族であるため、今回の結果は Ca 輸送に関わる一群のタンパク質の中に、Sr 選択性を持つ遺伝子が存在している事を示していると考えられる。

今回、マーカー探索に用いた階層ベイズ法は、複数疾患における複数分子の発現様式をも探索することができる手法である。したがって、この手法はマーカー分子の探索のみならず、複数分子同時イメージングによって得られた、分布の異なるイメージング画像から、診断情報を抽出できる統計解析手法として発展できるものと考えられる。

本研究によって、Sr を輸送する遺伝子が、膵β細胞イメージングによる糖尿病の早期診断に資する

新規マーカーとして利用できる可能性が示唆された。今後、この遺伝子を同定することにより、このタンパク質に結合する抗体・ペプチドや低分子化合物を創薬することで、これまでに分子プローブ化に成功しているソマトスタチンを利用した膵β細胞の複数分子同時イメージングによる糖尿病早期診断が実現できると思われる。

（糖尿病早期診断プローブの研究 ペプチド薬）

本研究では、早期糖尿病診断薬の開発を目的とし、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出可能な核医学プローブの開発を試みた。DOTA-octreotide の N 末アミノ酸を、ベンゼン環を持つアミノ酸である Tyrosine 2 個に置換した化合物が膵臓に比較的高い集積を示すことに着目し、Tyrosine よりも脂溶性の高い D-Phenylalanine (D-Phe) を、DOTA-octreotide の N 末に 2 個導入した化合物を設計し、その体内動態を検討し、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出可能な早期糖尿病診断薬としての可能性を検討した。

母体化合物である  $^{111}\text{In}$ -DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide (D-Phe 体) と、今回新たに開発した  $^{111}\text{In}$ -DOTA-D-Phe-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide (D-Phe-D-Phe 体) の電気的性質、血漿タンパク結合率、体内放射能分布について検討した。

これらの結果から、D-Phe-D-Phe 体は膵臓に非常に高い集積性を示し、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出可能な核医学プローブとなり得る可能性があると考え、1 型様糖尿病モデルマウスである、STZ マウスを用いて、D-Phe-D-Phe 体の体内放射能分布を検討した。投与後、膵臓への集積は、ノーマルマウスよりも STZ マウスの方がやや増加しており、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出することは不可能と考えられる。D-Phe-D-Phe 体は膵β細胞数が減少していると考えられる STZ マウスにおいても非常に高い膵臓集積を示したことから、D-Phe-D-Phe 体の膵臓集積メカニズムは他の octreotide 誘導体とは異なっている可能性が考えられる。今後、D-Phe-D-Phe 体の膵臓集積メカニズムを解明することで、新たな集積メカニズムを持つ新規プローブ開発に繋がる有益な知見が得られることが期待される。

（がん診断分子イメージングプローブの開発 抗体薬）

現在の GREI に適した撮像条件として、長時間撮像が可能な長い生物学的半減期、より少ないカウント数で検出可能な局所集積性が挙げられる。このような特徴を有する分子として、高い抗原特異性を持ち血中安定性の高い抗体の分子プローブ化が有効と考えられる。さらに、がん治療に用いられる抗体医薬は、医薬品として非常に高い特異性が求められるため、プローブ化後も高い特異的集積が見込まれる。本研究で用いたセツキシマブ、トラスツズマブ、ベバシズマブはいずれもがん治療に用いられる分子

標的治療薬であり、これらの分子プローブ化は薬剤の適応診断、治療効果のモニタリングなどにおいて非侵襲的な評価系が確立されることにつながり、意義は大きい。さらに、EGFR、HER2 はがん細胞自体に高発現する分子であり、VEGF は細胞株では発現が見られないががん組織中では発現が見られる、がん微小環境を構成する分子である。この様にごん細胞とその微小環境に発現する複数の分子を同時に解析することで、様々ながんに対応したイメージングが可能になり、またがん悪性度などの評価が可能になると考えられる。

本研究では  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-抗 EGFR 抗体、 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-抗 HER2 抗体、 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-抗 VEGF 抗体が 48 時間まで腫瘍部位へ特異的・局所的に高集積することが確認できた。周囲組織との集積コントラストも大きく、有用な複数分子プローブとなり得る。(がん診断分子イメージングプローブの開発 ペプチド薬)

キレート部分として DTPA や DOTA を持つ D-Phe-octreotide 誘導体は、 $^{111}\text{In}$  や  $^{90}\text{Y}$  のような 3 価の放射性金属と錯体を生成し、その錯体は、腫瘍診断薬や内用放射線腫瘍治療薬剤として、有用性が認められている。しかし、これらは腫瘍だけでなく、正常な腎臓にも非特異的に放射能が集積・滞留することが問題となっている。一方、これまでに、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide の *N* 末アミノ酸へ負電荷を導入することで、腎臓への放射能集積が低減する可能性があることが報告されている。本研究ではこの点に着目し、より精度の高い核医学プローブを開発することを目的とし、DOTA 結合体について、*N* 末アミノ酸への負電荷の導入が、化合物の極性や電荷及び腎放射能集積に及ぼす影響について検討した。

腎臓への放射能集積量を比較すると、負電荷を導入した Asp 体及び Asp-Asp 体は、D-Phe 体よりも投与後、腎放射能集積が低い傾向がみられた。さらに、負電荷を 2 つ導入した Asp-Asp 体は、負電荷 1 つの Asp 体よりも腎放射能集積の低減が認められた。一方これまでに、DTPA 結合体では、負電荷を導入した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide 誘導体の腎放射能集積が減少することが報告されている。 $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide 誘導体は、近位尿細管によって再吸収されると考えられているが、その近位尿細管細胞の管腔側の細胞膜は、負に帯電している。従って、負電荷を導入した誘導体は、代謝物全体が負に帯電し、管腔側細胞膜の負電荷との静電的な斥力によって再吸収が阻害されたと考えられている。本研究で検討した DOTA 結合体においても、*N* 末アミノ酸への負電荷の導入により、分子全体の電氣的性質が変化したため、その影響により腎放射能集積が低減する傾向があったものと考えられる。このことは、前述した Asp-Asp 体の腎クリアランスが増加していた結果とも合致している。

また、担癌マウスを用いた検討においても、ノーマルマウスでの結果と同様、Asp-Asp 体は D-Phe 体よりも低い腎集積を示した。また、腫瘍への集積も確認できた。さらに、担癌マウスにおける  $^{68}\text{Ga}$ -PET イメージングにおいても、 $^{111}\text{In}$  標識体での体内分布実験の結果と同様に、Asp-Asp 体は D-Phe 体よりも明らかに低い腎集積を示した。 $^{68}\text{Ga}$ -PET イメージングにおいても腎集積が低減していた結果は、DOTA-octreotide 誘導体の *N* 末アミノ酸への負電荷の導入により、腎放射能集積による妨害の少ない、明瞭な画像が得られる可能性を示している。

以上、本研究では、D-Phe 体、Asp 体及び Asp-Asp 体のマウス体内放射能動態を比較検討し、 $^{111}\text{In}$ -DOTA-octreotide 誘導体においても、DTPA 結合体と同様に *N* 末アミノ酸への負電荷の導入により、腎放射能集積が低減する可能性があることを見出した。

#### (新核医学核種の探索と RI 製造)

本研究により、放射性 Zn 同位体のペプチド標識条件が確定できた。しかしながら加熱により構造が変化してしまう抗体など高分子に関してはこの反応条件を用いることはできないため、より温和な条件下で反応可能なキレート剤の探索が必須と考えられる。また、市販  $^{54}\text{Mn}$  は高比放射能であるにも関わらず、標識ができず、また茶褐色の沈殿が見られたことから、多量の金属不純物が含まれていることが示唆された。そこで更に、イオン交換カラムによる精製を試みたが、Mn と他の金属の分配比に大きな差をつける条件がなく、十分な精製率を得ることは困難であった。したがって、 $^{54}\text{Mn}$  の標識利用には大型加速器を用いて高純度の  $^{54}\text{Mn}$  を製造使用する必要があると思われる。また、 $^{59}\text{Fe}$  に関しては、市販品の比放射能が低く低標識率であったが、中性子照射以外による製造が必要で高比放射能を得ることが困難であり、抗体分子の標識には適さないと考えられる。また、今回挙げた GREI イメージングに適用可能な放射性核種の内、 $^{52}\text{Mn}$ 、 $^{63}\text{Zn}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{124}\text{I}$  は陽電子を放出の割合が数十%以上あり、PET 診断核種としての併用も考えられる( $^{76}\text{Br}$ 、 $^{124}\text{I}$  は既に製造法や PET イメージングについて多数の報告がある)。上記には既に市販されている核種や製造技術を確立した核種も含まれるが、GREI での複数分子同時イメージングを実現するためには、高純度・高比放射能な放射性核種製造法の確立と、 $^{64}\text{Cu}$  と同程度の温和な反応条件で標識可能な核種ごとに適したキレート化合物が必要と言える。

## II. 装置開発と検証

- 1) Ge コンプトンカメラ (GREI) による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗
- 2) GREI の改良  
Si(Li)検出器は、単結晶でも厚い放射線検出器が

実現可能であり、高効率撮像素子のコンパクトな実装が可能であるため、Si/Ge コンプトンカメラ用の Si 検出器として適していると考えられる。また、理研で準備した両面直交ストリップ電極式 Si(Li)検出器は、1 keV 以下という優れたエネルギー分解能が実現可能であり、1 つのコンプトン散乱事象に対しては散乱角推定精度の理論限界であるドップラーブロードニングの影響を効率的に補正することが可能になると考えられ、コンプトンカメラを用いた低エネルギーガンマ線イメージングのブレークスルーとなる事が期待される。SPECT 検査においては、様々な臓器や組織、疾患に応じた多様な放射性医薬品が用いられているが、それらの多くは 200 keV 以下のガンマ線を放出する RI で標識されている。つまり、そのような低エネルギーのガンマ線を GREI で効率的に撮像することが可能になれば、既に臨床実用されている PET および SPECT 用の放射性医薬品と、GREI で新たに撮像可能となる放射性薬剤とを同条件で比較した画像解析が可能となり、より信頼性の高い診断情報の取得も可能になると考えられる。

また、2 台の Ge コンプトンカメラで構築されたアレイ型コンプトンカメラによる撮像実験で、本手法の有効性が実証された。コンプトンカメラの場合、必ずしも対称な位置にカメラを配置する必要は無く、撮像対象に応じた最適化が可能である。使用するコンプトンカメラの台数をより多くすれば、さらに撮像視野を拡大した高精度の 3 次元断層撮像が可能になると考えられる。

3) Si/CdTe コンプトンカメラ (現有) による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗い出し

4) Si/CdTe コンプトンカメラの改良

本本研究の撮像実験の研究結果は、Si/CdTe コンプトンカメラが、理化学研究所の Ge コンプトンカメラと同等のイメージング性能を有することを示しており、可搬型の複数分子同時イメージング装置の実現が期待される。

Si 半導体検出器に関する詳細な検討でその特性が解明されたことで、さらに高度化された信号処理系や撮像システムの設計が可能になった。これにより、さらに高性能でコンパクトな Si/CdTe コンプトンカメラの構築が可能になると期待される。

モンテカルロシミュレーションの結果より、SGD 検出器を小動物撮像用に最適化したコンプトンカメラを用いることで、mm レベルの空間分解能を持つ、新しい 3D ガンマ線イメージャーが実現可能であることが分かった。これまでのハードウェアテクノロジーを基礎としつつ、実用機にむけた取り組みを進めてゆく。

E. 結論

## I. 新核医学核種の探索と新プローブの創薬

- 1) 核種製造技術の確立と多核種同時イメージングに資する新核医学核種の探索
- 2) ニーズに合わせた新プローブ (標識化合物) の探索と合成
- 3) 2)の新プローブによる GREI を用いた多核種同時イメージング
- 4) 実用化のための基礎医学研究と他のモダリティとの比較研究

(糖尿病早期診断薬の開発とバイオインフォマティクスからのプローブ探索へのアプローチ)

本研究によって、Sr を輸送する遺伝子が、膵・細胞イメージングによる糖尿病の早期診断に資する新規マーカーとして利用できる可能性が示唆された。今後、この遺伝子を同定することにより、このタンパク質に結合する抗体・ペプチドや低分子化合物を創薬することで、これまでに分子プローブ化に成功しているソマトスタチンを利用した膵・細胞の複数分子同時イメージングによる糖尿病早期診断が実現できると思われる。

(糖尿病早期診断薬の研究 ペプチド薬)

本研究では、これまでに得られた知見を基に、ベンゼン環含有アミノ酸を2つ導入した化合物である D-Phe-D-Phe 体を設計・合成した。対照化合物として D-Phe 体を用いて、D-Phe-D-Phe 体の物性やマウス体内放射能動態を比較検討した結果、D-Phe-D-Phe 体は、特徴的な体内動態を示し、投与初期での膵臓の集積は、極めて高いことがわかった。そこで、1 型様糖尿病モデルマウスである、STZ マウスを用いて、D-Phe-D-Phe 体の膵臓集積の変化を検討したが、膵臓集積の減少は認められなかった。以上の結果より、D-Phe-D-Phe 体を早期糖尿病診断として用いられる可能性は低いものの、その膵臓集積のメカニズムを解明することで、新たなプローブ開発に繋がる有益な知見が得られることが期待される。

(がん分子イメージングプローブの創薬 抗体薬)

本研究によって<sup>64</sup>Cu-DOTA-抗EGFR抗体、<sup>64</sup>Cu-DOTA-抗HER2抗体、<sup>64</sup>Cu-DOTA-抗VEGF抗体ががん複数分子イメージングに有用であることが示唆された。今後これらを他のγ線放出金属核種 (<sup>54</sup>Mn、<sup>65</sup>Zn など) で標識することにより、GREI撮像を可能にするとともに、がん複数分子イメージング法の検討が実現できると思われる。がん複数分子同時イメージングに適用可能な3分子についてプローブ化に成功した。

(がん診断分子イメージングプローブの開発 ペプチド薬)

腎臓での放射能集積・滞留を軽減した内用放射線腫瘍治療薬を開発する上での基礎的指針を得ることを目的とし、DOTA結合 octreotide 誘導体について、N 末アミノ酸への負電荷の導入が、化合物の極性や電荷及び腎放射能集積に与える影響を検討した。本研

究では、対照化合物として<sup>111</sup>In-DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide (D-Phe体)を合成し、N末アミノ酸に負電荷を導入した<sup>111</sup>In-DOTA-Asp<sup>1</sup>-octreotide (Asp体)、<sup>111</sup>In-DOTA-Asp-Asp<sup>1</sup>-octreotide (Asp-Asp体)を合成し、それらの物性やマウス体内放射能動態を比較検討した。その結果、DOTA結合octreotide誘導体においても、DTPA結合体と同様にN末アミノ酸への負電荷の導入により腎放射能集積が低減する可能性があることを見出した。この結果は、D-Phe-octreotide誘導体においては、キレート部位の構造に関わらず、負電荷の導入が腎放射能集積の低減に有効であることを示唆している。さらに、担癌マウスを用いた検討において、腫瘍集積性も保持している可能性があることを明らかにした。本研究結果は、正常な腎臓への集積を低減した、高精度な核医学プローブの開発に有用な知見を与えるものと考えられる。

(新核医学核種の探索とRI製造)

本研究によりペプチドなど熱に耐性のある小分子に関しては複数核種での標識(<sup>64</sup>Cuと<sup>65</sup>Znまたは<sup>68</sup>Gaと<sup>65</sup>Znなど)が可能となった。しかし、熱により活性が失われる抗体など大分子に関してはそれぞれの核種に適した温和な反応条件による標識方法の探索が必要である。今回挙げた候補核種についても、標識可能な反応条件が確立された後に、高純度・高比放射能な製造法の確立を行うべきである。

## II. 装置開発と検証

- 1) Ge コンプトンカメラ (GREI) による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗
- 2) GREIの改良

共同事業であるNEDOの機器開発先導研究プロジェクトで開発中のSi/Geおよびアレイ型コンプトンカメラによる、複数分子同時イメージング装置としての撮像性能の向上について検討を行った。約 200 keV以下のエネルギーのガンマ線を効率的にコンプトンイメージングするために考案されたSi/Geコンプトンカメラ用のSi検出器として、JAXAが開発中のSiストリップ検出器やSiパッド検出器に加えて、両面直交ストリップ電極式Si(Li)検出器の利用可能性が検討された。Si(Li)検出器は、単結晶でも厚い放射線検出器が実現可能であり、高効率撮像素子のコンパクトな実装が可能であるため、Si/Geコンプトンカメラ用のSi検出器として適していると考えられ、ドップラーロードニングの影響の効率的な補正の可能性が示された。また、撮像視野を拡大し、より高精度な3次元断層画像の取得の可能性を検討するため、2台のGeコンプトンカメラを撮像対象の周囲に配置したアレイ型コンプトンカメラを構築し、2つの<sup>54</sup>Mnの球状ガンマ線源を撮像視野中心に配置して撮像実験を行った。この撮像実験で、本手法の有効性が実証され、使用するコンプトンカメラの台数をより多くすれば、さらに撮像視野を拡大した高精

度の3次元断層撮像が可能になると期待された。

- 3) Si/CdTe コンプトンカメラ (現有) による実験動物の複数分子同時イメージングと改良点洗い出し
- 4) Si/CdTe コンプトンカメラの改良

宇宙γ線観測技術を活用し、NEDO 事業で構築された Si/CdTe コンプトンカメラシステムを用いた小動物等の撮像実験の結果を踏まえた検討の結果、臨床用装置としての撮像性能が明らかになった。また、Si 半導体検出器に関する詳細な検討でその特性が解明されたことで、より高度化された信号処理系や撮像システムの設計が可能になった。宇宙γ線観測で培われた技術が導入されることで、可搬型で高性能な Si/CdTe コンプトンカメラが構築され、近接撮像による高精度の画像診断が可能になると期待される。

## F. 健康危険情報

臨床研究および動物研究において、本研究に用いた医薬品、化学物質等に起因すると考えられる副作用、健康危険情報はなかった。

## G. 研究発表

1. 論文発表

### 【原著論文】

- (1) Fujishiro H, Okugaki S, Yasumitsu S, Enomoto S, Himeno S, "Involvement of DNA hypermethylation in down-regulation of the zinc transporter ZIP8 in cadmium-resistant metallothionein-null cells", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241(2), 195-201 (2009).
- (2) Yatagai F, Takahashi A, Honma M, Suzuki H, Omori K, Seki M, Hashizume T, Shimazu T, Enomoto S, Ohnishi T, Ishioka N, "LOH analyses for biological effects of space radiation: Human cell culture in "Kibo" of International Space Station" *Biological Sciences in Space*, 23(1), 11-16 (2009).

### 【総説】

- (1) 本村 信治, 榎本秀一, 半導体コンプトンカメラによる複数分子同時イメージング法の開発, 電気学会技術報告, 印刷中
- (2) Yatagai F, Sugawara K, Enomoto S, Honma M, "An approach to estimate radioadaptation from DSB repair efficiency", *Journal of Radiation Research*, 50(5), 407-413 (2009).
- (3) 本村 信治, 榎本 秀一, "複数分子同時イメージ

ングの医療応用実現に向けて：医療用コンプトンカメラの開発最前線" メディカルバイオ Vol.6 47-52 (2009).

- (4) 金山 洋介, 本村 信治, 榎本 秀一, "半導体コンプトンカメラによる複数分子同時イメージング法の開発" ぶんせき,9, 496-502 (2009).

【プロシーディングス】

- (1) Motomura.S, Fukuchi.T, Kanayama.Y, Haba.H, Watanabe.Y, Enomoto.S, "Three-dimensional tomographic imaging by semiconductor Compton camera GREI for multiple molecular simultaneous imaging" 2009 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, Orlando, USA, 2009 10, IEEE, USA Piscataway, 3330-3332 (2009).

2. 学会発表

- (1) 本村 信治, 福地 知則, 金山 洋介, 羽場 宏光, 渡辺 恭良, 榎本 秀一, "複数分子同時イメージング実現に向けた半導体コンプトンカメラ GREI による3次元トモグラフィックイメージング" 第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会 東京 2009年5月.
- (2) 金山 洋介, 本村 信治, 福地 知則, 角田 ちぬよ, 松本 恭子, 和田 康弘, 林中 恵美, 渡辺 恭良, 榎本 秀一, "半導体コンプトンカメラを用いた複数分子腫瘍イメージング" 第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 東京, 2009年5月.
- (3) 福地 知則, 本村 信治, 金山 洋介, 羽場 宏光, 渡辺 恭良, 榎本 秀一, "複数分子同時イメージング用コンプトンカメラの高度化" 第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 東京, 2009年5月.
- (4) S.Enomoto, "Multi-molecular Imaging by Using Compton Telescope as a New Tool for Nuclear Medical Diagnosis" 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009) Seoul, Korea, 2009年5月.
- (5) T.Fukuchi, S.Motomura, Y.Kanayama, H.Haba, Y.Watanabe, S.Enomoto, "Ge semiconductor Compton camera for multiple molecular imaging" 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009), Seoul, Korea, 2009年5月.
- (6) Y.Kanayama, S.Motomura, T.Fukuchi, C.Sumita,

Y.Matsumoto, E.Hayashinaka, Y.Wada, Y.Watanabe, S.Enomoto, "In vivo tumor imaging using semiconductor Compton camera" International Symposium on Metallomics 2009 Cincinnati, U.S. A., 2009年6月.

- (7) 金山 洋介, 本村 信治, 福地 知則, 角田 ちぬよ, 松本 恭子, 林中 恵美, 和田 康弘, 渡辺 恭良, 榎本 秀一, "半導体コンプトンカメラのための分子プローブ探索" 第19回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 吹田, 2009年6月.
- (8) 榎本 秀一, "複数分子同時イメージングと創薬：我が国発の新装置の世界発信" シンポジウム「最先端計測技術のトレンド 2009：創薬から生体試料や環境試料分析, 犯罪捜査への応用」, 岡山, 2009年6月.
- (9) 榎本 秀一, "生体内金属元素のダイナミクス：複数分子同時イメージングによるアプローチ" 第20回日本微量元素学会, 東京, 2009年7月.
- (10) 廣村 信, 齋藤 大地, 榎本 秀一, "亜鉛トランスポーターZip13の解析" 第20回日本微量元素学会, 東京, 2009年7月.
- (11) 藤代 瞳, 窪田 圭佑, 三好 亜依, 榎本 秀一, 姫野 誠一郎, "カドミウム耐性細胞におけるマンガン交叉耐性とその機構" 第20回日本微量元素学会, 東京, 2009年7月.
- (12) 榎本 秀一, "生命現象の可視化技術：イメージング技術による創薬プロセスの革新と迅速化" 岡山大学公開講座「第21回現代の薬学」, 岡山, 2009年7月.
- (13) 榎本 秀一, "岡山発の分子イメージング研究の推進：世界初の複数分子同時イメージングとイメージングプローブ（放射性医薬品）の創薬研究とマイクロドージング" 岡山大学医歯薬学総合研究科創薬生命科学専攻シンポジウム, 岡山, 2009年9月.
- (14) 榎本 秀一, "次世代核医学診断モダリティの創出：複数分子同時イメージング装置の開発と分子イメージングプローブ創薬" 第18回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 2009年9月.
- (15) 榎本 秀一, "理研 CMIS 岡山分室開設と今後の分子イメージング研究への期待" 岡山大&理研ジョイントセミナー, 岡山, 2009年9月.

- 月.
- (16) S.Enomoto, Y.Kanayama, S.Motomura, T.Fukuchi, C.Sumita, Y.Matsumoto, E.Hayashinaka, Y.Wada, Y.Watanabe, "In vivo Imaging of Tumors with Antibody Probes Using Semiconductor Compton Camera" 2009 World Molecular Imaging Congress, Montreal, Canada, 2009年9月.
- (17) Y.Kanayama, C.Sumita, K.Hasegawa, Y.Wada, E.Hayashinaka, S.Enomoto, S.Kojima, Y.Watanabe, "PET imaging of proteolytic TGF-beta1 activation reaction in mice" World Molecular Imaging Congress 2009 Montreal, Canada, 2009年9月.
- (18) 谷田貝 文夫, 高橋 昭久, 本間 正充, 鈴木 ひろみ, 大森 克徳, 関 真也, 橋爪 藤子, 鶴飼 明子, 嶋津 徹, 堂前 直, 榎本 秀一, 大西 武雄, 石岡 憲昭, "「きぼう」利用実験: ヒト培養細胞の突然変異 (LOH) 解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み" 日本宇宙生物科学会第23回大会, つくば市, 2009年10月.
- (19) 榎本 秀一, "複数分子同時イメージング技術の開発と理化学研究所における分子イメージング研究の展開" 第82回岡山県医用工学研究会, 岡山, 2009年10月.
- (20) 齋藤 大地, 廣村 信, 榎本 秀一, "階層ベイズモデルを用いた乳癌における亜鉛トランスポーターの遺伝子発現量の解析" メタロチオネインおよびメタロバイオサイエンス研究会 2009, 東京, 2009年10月.
- (21) 廣村 信, 齋藤 大地, 榎本 秀一, "マウス亜鉛トランスポーターZip13 の解析" メタロチオネインおよびメタロバイオサイエンス研究会 2009, 東京, 2009年10月.
- (22) 谷田貝 文夫, 高橋 昭久, 本間 正充, 鈴木 ひろみ, 大森 克徳, 関 真也, 橋爪 藤子, 鶴飼 明子, 嶋津 徹, 榎本 秀一, 堂前 直, 大西 武雄, 石岡 憲昭, "宇宙環境 (放射線と低重力) のヒト培養細胞に及ぼす影響: 突然変異 (LOH) 解析からのアプローチ" 日本マイクログラフィティ応用学会 第24回学術講演会, 那覇市, 2009年10月.
- (23) T.Fukuchi, S.Motomura, Y.Kanayama, S.Takeda, H.Haba, Y.Watanabe, S.Enomoto, "Pulse shape analysis for Ge semiconductor Compton camera" 3rd Joint Meeting of the Nuclear Physics Divisions of the APS and PSJ, Hawaii, U. S. A., 2009年10月.
- (24) 廣村 信, 齋藤 大地, 榎本 秀一, "亜鉛トランスポーターZip13 の解析" 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月.
- (25) S.Motomura, T.Fukuchi, Y.Kanayama, H.Haba, Y.Watanabe, S.Enomoto, "Three-dimensional tomographic imaging by semiconductor Compton camera GREI for multiple molecular simultaneous imaging" 2009 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, Orlando, U. S. A., 2009年10月.
- (26) 谷田貝 文夫, 高橋 昭久, 本間 正充, 鈴木 ひろみ, 大森 克徳, 関 真也, 橋爪 藤子, 鶴飼 明子, 嶋津 徹, 榎本 秀一, 堂前 直, 大西 武雄, 石岡 憲昭, "国際宇宙ステーション利用実験: ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み" 日本環境変異原学会第38回大会, 清水市, 2009年11月.
- (27) 榎本 秀一, "複数分子同時イメージングのための創薬研究" 分子イメージングシンポジウム 2010, 東京, 2010年1月.
- (28) 武田 伸一郎, 執行 信治, 榎本 秀一, 福地 知則, 金山 洋介, 齋藤 大地, 廣村 信, "半導体コンプトンカメラによる複数分子同時イメージング法の開拓" 分子イメージング研究シンポジウム 2010「未来を拓く創薬・疾患診断研究」, 東京, 2010年1月.
- (29) 谷田貝 文夫, 本間 正充, 鶴飼 明子, 榎本 秀一, 堂前 直, 大森 克徳, 石岡 憲昭, "ISS 実験: 突然変異の検出と適応応答の検証" 宇宙利用シンポジウム (第26回), 相模原市, 2010年1月.
- (30) 榎本 秀一, "分子イメージング技術による疾病診断と創薬 ~生活習慣病のイメージングと診断への薬学からのアプローチ~" 第17回糖尿病セミナーUP-TO-DATE, 岡山, 2010年2月.
- (31) 榎本 秀一, "種々の $\gamma$ 線放出核を用いた早期疾患診断プローブ開発とコンプトンカメラによる複数核種同時イメージング" 平成21年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業 医療機器開発推進研究「ナノメディシン研究成果発表会」, 東京, 2010年2月.
- (32) S.Takeda, S.Ishikawa, H.Odaka, S.Watanabe,

- T.Takahashi, H.Tajima, N.Kawachi, T.Nakano, S.Enomoto, "Simulation study of 3-D gamma-ray imager with Si/CdTe semiconductor Compton camera" IEEE Sensors Application Symposium 2010, Limerick, Ireland, 2010年2月.
- (33) 神野 伸一郎, 堀尾 有加, 巽 朝菜, 米田 誠二, 堀込 純, 山口 敬子, 廣田 俊, 藤田 芳一, 榎本 秀一, "凝集誘起発光特性(AIEE)を光スイッチとするローダミン様化合物の創製", 第8回 ナノテクシンポジウム「フォトニクス研究の推進とナノテクノロジー支援の可能性」, 奈良, 2010年3月.
- (34) 福地 知則, 本村 信治, 武田 伸一郎, 金山 洋介, 羽場 宏光, 渡辺 恭良, 榎本 秀一, "デジタル波形解析による半導体コンプトンカメラの高度化" 日本物理学会第65回年次大会, 岡山大学, 2010年3月.
- (35) 金山 洋介, 本村 信治, 福地 知則, 廣村 信, 角田 ちぬよ, 渡辺 恭良, 榎本 秀一, "半導体コンプトンカメラによる複数分子同時イメージング法の開発" 第8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, 岡山, 2010年3月.
- (36) 門脇 沙緒莉, 北村 陽二, 廣村 信, 神野 伸一郎, 中島 聡, 御船 正樹, 吉川 豊, 佐治 英郎, 榎本 秀一, "経口糖尿病治療薬としての Zn-DTS 錯体の開発" 第8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, 岡山, 2010年3月.
- (37) 堀尾 有加, 神野 伸一郎, 巽 朝菜, 山口 敬子, 米田 誠治, 堀込 純, 榎本 秀一, 藤田 芳一, " $\pi$ 電子拡張型ローダミン様化合物の合成と凝集誘起発光特性" 第8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, 岡山, 2010年3月.
- (38) 八木 克治, 東川 桂, 渡邊 恵子, 村上 純, 廣村 信, 金山 洋介, 榎本 秀一, "マウス大腸癌における CTLA-4 による腫瘍イメージング法の検討" 第8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, 岡山, 2010年3月.
- (39) 谷口 将済, 渡邊 恵子, 門脇 沙緒莉, 神野 伸一郎, 廣村 信, 神戸 大朋, 榎本 秀一, "チロシンキナーゼシグナル伝達における亜鉛トランスポーターの関与" 第8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, 岡山, 2010年3月.
- (40) 榎本 秀一, "大型加速器を用いたマルチトレーサーによる多元素同時代謝追跡手法の確立と新規計測法の開発研究" 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (41) 榎本 秀一, "見えないものを見えるようにする技術: 生命現象を分子イメージングで可視化、創薬に革命が起こる? 薬学からの発信" 日本薬学会第130年会: 高校生シンポジウム, 岡山, 2010年3月.
- (42) 廣村 信, 榎本 秀一, "複数分子同時イメージング法による非侵襲的バイオメタルイメージングとその応用", 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (43) 神野 伸一郎, 堀尾 有加, 巽 朝菜, 箕浦 克彦, 堀込 純, 山口 敬子, 市川 隼人, 宇佐美 吉英, 廣田 俊, 藤田 芳一, 榎本 秀一, "凝集誘起発光特性(AIE)を光スイッチとする新規蛍光プローブの開発" 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (44) 門脇 沙緒莉, 巽 朝菜, 神野 伸一郎, 中島 聡, 北村 陽二, 廣村 信, 御船 正樹, 吉川 豊, 佐治 英郎, 榎本 秀一, "糖尿病治療薬剤としての Zn-DTS 錯体の開発" 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (45) 山崎 公輔, 塚田 正道, 遠藤 和豊, 本田 智香子, 松岡 圭介, 松本 謙一郎, 安西 和紀, 榎本 秀一, "マルチトレーサー法と放射化分析法による Se 欠乏ラット胆汁中の微量元素の動態の解析" 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (46) 東川 桂, 八木 克治, 渡邊 恵子, 加来田 博貴, 金山 洋介, 廣村 信, 榎本 秀一, "炎症性サイトカインを標的とする潰瘍性大腸炎診断プローブの探索" 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (47) 谷口 将済, 渡邊 恵子, 門脇 沙緒莉, 神野 伸一郎, 廣村 信, 神戸 大朋, 榎本 秀一, "チロシンキナーゼシグナル伝達における亜鉛トランスポーターの関与" 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (48) 八木 克治, 東川 桂, 渡邊 恵子, 村上 純, 廣村 信, 金山 洋介, 榎本 秀一, "マウス大腸癌における CTLA-4 による腫瘍イメージング法の検討"



" 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.

- (49) 竹中 文章, 神野 伸一郎, 北村 陽二, 金山 洋介, 榎本 秀一, 秋澤 宏行, 荒野 泰, "N 末アミノ酸を置換した  $^{111}\text{In}$ -DOTA 結合 octreotide 誘導体の体内動態に関する検討" 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- (1) 本村信治, 榎本秀一, コンプトン撮像カメラ、特許 4486623, 2010.4.2

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- (1) 榎本秀一, 記事, 岡山大理研と連携大学院, 山陽新聞, 2010.5.7.  
(2) 榎本秀一, 記事, 異なる病気同時診断, 日経産業新聞, 2010.3.24.  
(3) 榎本秀一, 記事, 糖尿病 PET で早期兆候発見, 日経産業新聞, 2010.3.9.  
(4) 榎本秀一, 記事, 「分子イメージング」技術 榎本・岡山大教授ら研究, 山陽新聞, 2010.1.13  
(5) 榎本秀一, 理研の最前線 117, 次世代医療技術の創出をめざす, 日刊工業新聞, 2009.6.

糖尿病初期診断の新規プローブ探索および合成と、PET または GREI 装置を用いた

イメージングに関する研究

分担研究者・片岡 洋祐 独立行政法人理化学研究所・神戸研究所・分子イメージング科学研究センター・細胞機能イメージング研究チーム・チームリーダー

研究要旨：本研究は、複数の核種でラベルした複数の生体分子などを同時イメージングすることで新たな分子イメージングモダリティとして、コンプトンカメラ方式の多核種同時イメージング装置を採用した。当該装置に利用可能なプローブとなる新規医薬品開発が必須であるので、臨床用新プローブ候補物質を探索、創薬を行い、既存モダリティであるPET、SPECT等と比較し、複数分子イメージング機器の臨床装置と新プローブの創出を目指す。生活習慣病である糖尿病の発症は環境・遺伝的因子を含めた多因子疾患である。複数分子イメージングの優位性を示すためには、糖尿病発症に深くかかわる多因子に対する分子プローブ創薬が必須である。本年度は、糖尿病発症に関わる新規バイオマーカー探索において、GREIによる肥満・糖尿病モデル動物の微量元素イメージングとバイオインフォマティクスを駆使した新規マーカー分子の探索を行った。

A. 研究目的

近年、膵β細胞の増減が、糖尿病の発症と関連していることが報告されており、膵β細胞の非侵襲的・定量的なイメージングは、糖尿病の発症初期段階における早期診断に重要であり、かつ、世界的に、その実現が望まれている。膵β細胞の非侵襲的・定量的なイメージングは、遺伝子、タンパク質、脂質・糖質代謝物質など多因子変化を同時に捉える事で、より適確に膵β細胞の状態を把握することが可能になると考えられる。

これまでに、膵β細胞のイメージングを目指した<sup>68</sup>Ga-DOTA-ソマトスタチンの創薬開発と PET イメージングを行い、膵β細胞イメージングの実証に成功した。しかしながら、複数分子同時イメージング法の確立のためには、さらなる分子マーカーの探索が必要である。

本年度は肥満・糖尿病状態で変化することが知られている生体内微量元素の変化に着目し、GREI イメージングとマルチトレーサー実験から膵臓でユニークに変化する微量元素を同定し、この微量元素の動態に関わる遺伝子を階層ベイズ法によるバイオインフォマティクスを利用して、公共データベースから候補因子の選択を行った。

B. 研究方法

＜肥満・糖尿病モデルマウスの作製＞

C57B/6J マウス（7 週令、雄）に高脂肪食を与え、肥満・糖尿病モデルマウスを作製した。対照群は通常食とした。毎週の血糖値モニタリングおよび体重測定を行い、高脂肪食負荷開始の 26 週目で糖負荷試験を行い、糖尿病状態と判定した。

(1)肥満・糖尿病モデルマウスの生体微量元素の分布

上記マウスに理研・仁科加速器センターが保有する大型加速器で製造したマルチトレーサー溶液を尾静脈投与し、投与後、6 時間、12 時間目における各組織内 RI 分布を高純度 Ge 半導体検出器により測定した。コントロール実験として、通常食で飼育した同週令の C57B/6J マウス（雄）を用いた。

(2)肥満・糖尿病モデル動物の GREI イメージング

同肥満・糖尿病モデル動物に、それぞれ 2 MBq ずつの<sup>65</sup>ZnCl<sub>2</sub>、<sup>54</sup>MnCl<sub>2</sub>、<sup>85</sup>SrCl<sub>2</sub> 混合溶液を尾静脈から投与し、投与後 15 分から 12 時間 GREI イメージングを行った。撮像対象コントロールとして通常食で飼育した同週令の C57B/6J マウス（雄）を用いた。

(3) 階層ベイズ法による新規マーカー遺伝子の探索  
公共データベース（NCBI: National Center for Biotechnology Information、EMBL: European Bioinformatics Institute）で公開している、肥満・糖尿状の膵臓遺伝子発現プロファイルを用いて、階層ベイズ法による統計解析により、肥満・糖尿状態で発現変動する金属輸送遺伝子に着目した In silico スクリーニングを行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は事前に所属施設の動物実験委員会の承認を得て、当該施設の動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) マルチトレーサー実験による生体微量元素の時間依存的な組織分布を検討した結果、膵β細胞におい

てインスリン分泌や合成、細胞機能に重要な Zn や Mn 等が、コントロールマウスで測定された時間依存的な代謝反応が、肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓組織においては見られなかった。この結果は、疾患モデルにおいて、これら金属元素の吸収や排泄等の生体反応が低下していると考えられた。この代謝反応の低下は膵臓のみならず、インスリンが標的とする肝臓や脂肪組織においても見られた。一方、このマルチトレーサー実験結果から得られたユニークな金属元素の代謝として、Sr が肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓組織において測定できた。

(2) マルチトレーサー実験から得られた結果をもとに、GREI を用いて  $\gamma$  線放出核種である  $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{54}\text{Mn}$  および  $^{85}\text{Sr}$  の 3 核種を使った複数分子同時イメージングを行った。12 時間の撮像実験結果から 3 時間毎の 2D 再構成画像を作製し、コントロールマウスと肥満・糖尿病モデルマウスの代謝イメージングを比較したところ、肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓周辺および心臓周辺においてのみ変化する Sr 代謝イメージングに成功した。また、Sr の代謝反応は撮像開始 6~9 時間で組織における吸収が最大となり、12 時間では排泄され、撮像開始後 3 時間のレベルと同等であるという、これまでに全く報告のない新規知見、および、先のマルチトレーサー実験を反映した結果を得た。

マルチトレーサー実験と GREI イメージング実験の結果から、Sr 輸送に関わる遺伝子が糖尿病状態における膵臓イメージングを可能にする新規候補因子であることが示唆された。

(3) Sr を輸送する遺伝子の探索として、階層ベイズモデル法を導入した統計解析手法を構築し、公共データベースを利用した *in silico* スクリーニングを行った。階層ベイズモデル法は、実験毎のデータ、もしくは DNA アレイに使われる同一遺伝子の異なる配列を認識する複数のプローブ間等のデータ、さらに、既存のプローブが単一疾患における遺伝子発現レベルの差異に着目していたことに対して、複数疾患における複数分子の発現様式をも探索することができる手法である。この統計解析手法を用いて、肥満・糖尿病モデルマウスの膵臓組織から Sr を輸送すると考えられる金属輸送タンパク質を約 20 種類同定した。この候補遺伝子の中には Ca 輸送タンパク質ファミリーである TRPM および TRPV ファミリーに属する遺伝子や、ATPase 駆動型 2 価イオン輸送タンパク質等が含まれていた。

#### D. 考察

複数分子同時イメージングによる膵 $\beta$ 細胞イメージングの新規マーカー分子探索において、生体微量金属元素の代謝過程という観点から精査したところ、Sr 輸送タンパク質が新規マーカー遺伝子になることが判明した。

これまでに、糖尿病の膵臓組織をはじめインスリン標的末梢組織において、代謝異常により、Zn、Mn、Mg や Ca などの金属元素濃度が低下していることが知られている。逆に、肥満・糖尿病状態で変化するユニークな金属元素を同定できれば、それを調節する遺伝子を同定することで、疾患診断に有用な特徴的マーカー分子が発見できる考えられる。本研究は、上記着眼点のもと行い、肥満・糖尿病状態の膵臓組織および心臓において、Sr の代謝に関わる遺伝子が発現していることを示唆する結果を得た。この遺伝子の探索として、階層ベイズモデル法による統計解析から *in silico* スクリーニングを行い、約 20 種類の金属輸送タンパク質をコードする遺伝子を同定した。この中には Ca 輸送タンパク質である TRPM や TRPV ファミリーに属する遺伝子が含まれていた。ファミリー遺伝子はアミノ酸配列の相同性から分類されており、未だ機能未知な遺伝子も存在している。Sr は元素周期表上、Ca と同族であるため、今回の結果は Ca 輸送に関わる一群のタンパク質の中に、Sr 選択性を持つ遺伝子が存在している事を示していると考えられる。

今回、マーカー探索に用いた階層ベイズ法は、複数疾患における複数分子の発現様式をも探索することができる手法である。したがって、この手法はマーカー分子の探索のみならず、複数分子同時イメージングによって得られた、分布の異なるイメージング画像から、診断情報を抽出できる統計解析手法として発展できるものと考えられる。

#### E. 結論

本研究によって、Sr を輸送する遺伝子が、膵 $\beta$ 細胞イメージングによる糖尿病の早期診断に資する新規マーカーとして利用できる可能性が示唆された。今後、この遺伝子を同定することにより、このタンパク質に結合する抗体・ペプチドや低分子化合物を創薬することで、これまでに分子プローブ化に成功しているソマトスタチンを利用した膵 $\beta$ 細胞の複数分子同時イメージングによる糖尿病早期診断が実現できると思われる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

#### 英文論文

- (1) Yamato, M., Kataoka, Y., Mizuma, H., Wada, Y., and Watanabe, Y. Positron emission tomography and macro- and micro-autoradiographic studies combined with immunohistochemistry on rat intestinal ulceration and healing processes. *J. Nucl. Med.* 50, 1-8 (2009).
- (2) Jin, G., Kataoka, Y., Tanaka, M., Mizuma, H., Nozaki, S., Tahara, T., Mizuno, K., Yamato, M., and Watanabe, Y. Changes in plasma and tissue amino acid levels in an animal model of complex fatigue.

Nutrition. 25 (5), 597-607 (2009). [Epub 2009 Feb 11]

- (3) Cui, Y., Takashima, T., Takashima-Hirano, M., Wada, Y., Shukuri, M., Tamura, Y., Doi, H., Onoe, H., Kataoka, Y., and Watanabe, Y. [<sup>11</sup>C]PK11195 PET for the in vivo evaluation of neuroinflammation in the rat brain after cortical spreading depression. *J. Nucl. Med.* 50: 1904-1911 (2009).
- (4) Nozaki, S., Mizuma, H., Tanaka, M., Jin, G., Tahara, T., Mizuno, K., Yamato, M., Okuyama, K., Eguchi, A., Akimoto, K., Kitayoshi, T., Mochizuki-Oda, Noriko., Kataoka, Y., and Watanabe, Y. Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide improves energy metabolism and physical performance during physical-fatigue loading in rats. *Nutr. Res.* 29: 867-872 (2009).
- (5) Yamano, M., Fukuda, S., Joudoi, T., Mizuno, K., Tanaka, M., Kataoka, Y., Kawatani, J., Takano, M., Tomoda, A., Imai-Matsumura, K., Miike, T., Matsuda, F., and Watanabe, Y. Temperament and character as predictors of fatigue-induced symptoms among school children in Japan: a 1-year follow-up study. *Compr. Psychiatry* 51: 256-65 (2010)
- (6) Akazawa, K., Cui, Y., Tanaka, M., Kataoka, Y., Yoneda, Y., and Watanabe, Y. Mapping of regional brain activation in response to fatigue-load and recovery in rats with c-Fos immunohistochemistry. *Neurosci. Res.* 66: 372-379 (2010)
- (7) Tajima, S., Yamamoto, S., Tanaka, M., Kataoka, Y., Iwase, M., Yoshikawa, E., Okada, H., Onoe, H., Tsukada, H., Kuratsune, H., Ouchi, Y., and Watanabe, Y. Medial orbitofrontal cortex is associated with fatigue sensation. *Neurol. Res. Int.* in press.

#### 和文論文

- (1) 片岡洋祐 脳科学研究における光技術と光プローブ 電気学会研究会資料 (光・量子デバイス研究会) 33-36 (2009).
- (2) 片岡洋祐 神経への低反応レベルレーザー作用の基礎科学 日本レーザー治療学会誌 8, No. 2: 36-40 (2009).
- (3) 片岡洋祐, 宇都宮一泰、金原紀章、福島一夫、森巍、柴淳、宇都宮幸子、長谷部靖子、西田邦彦、濱本研、古川哲、奥田拓道、水野敬、馬場吉武、野澤歩、片岡喜由、角田隆巳 テアニン高含有緑

茶抹摂取による高齢者の認知症予防効果 日本未病システム学会誌 Vol. 15, No. 1, 17-23 (2009).

#### 2. 学会発表

##### 国際学会

- (1) Sako, T., Kanayama, Y., Hasegawa, K., Nishimura, M., Cui, Y., Kataoka, Y., Wada, Y., Senda, M., Watanabe, Y. PET imaging of the pancreas with[<sup>68</sup>Ga]DOTA-Octreotide: a potential biomarker for beta cell mass measurement. World Molecular Imaging Congress 2009 (The Palais des Congres de Montreal, Canada), September 23-26, 2009.
- (2) 2. Yamato, M., Okuyama K., Jin, G., Eguchi, A., Watanabe Y., Kataoka, Y., Interleukin-1beta expression in the brain is involved in poly I:C-induced immunological fatigue-like behavior in rats. The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience 2009 (Chicago, USA), October 17-21, 2009.
- (3) Kataoka, Y. Mechanism of inactivation of neural activity in LLLT. The 18<sup>th</sup> World congress of the International Society for Laser Surgery and Medicine (Tokyo, Japan), November 30, 2009. (moderator for the session "LLLT in neural system" and Symposist)
- (4) Kataoka, Y. Adenosine triphosphate (ATP) in mechanism of LLLT. The 2<sup>nd</sup> World Federation of Societies for Laser Medicine and Surgery (Tokyo, Japan), December 1, 2009. (Symposium)

##### 国内学会

- (1) 片岡洋祐、大和正典、金光華、渡辺恭良 筋肉疲労および感染・炎症性疲労モデル動物を用いた疲労の分子・神経メカニズム 第5回日本疲労学会 (福岡・九州大学) 平成21年5月15-16日 (シンポジウム)
- (2) 山野恵美、福田早苗、水野敬、田中雅彰、片岡洋祐、上土井貴子、川谷淳子、高野美雪、友田明美、松村京子、三池輝久、渡辺恭良 疲労関連症状出現と心理社会的予測因子の検討 - 追跡調査の結果から - 第5回日本疲労学会 (福岡・九州大学) 平成21年5月15-16日
- (3) 片岡洋祐 神経への低反応レベルレーザー作用の基礎科学 第21回日本レーザー治療学会モーニングセミナー (神戸・神戸国際会議場) 平成21年7月4-5日 (招待講演)