

# 糖尿病の病態解明及び新規糖尿病薬の開発を目指した PET/SPECT 用

## 膵島β細胞イメージングプローブの創生とその応用

京都大学環境安全保健機構

放射性同位元素総合センター

木村 寛之

### 【背景】

日本国内の糖尿病患者とその予備群は、平成 18 年の段階で合計 1870 万人と推計されており、罹患者数は増加し続けている。現在のところ、糖尿病は空腹時高血糖と経口糖負荷試験 (OGTT) での慢性高血糖の持続を確認して診断されているが、血糖値の判定そのものは糖尿病という病気の診断とは異なるとされ、境界型と呼ばれる値を示す場合、糖尿病と確定的な診断が下せず早期診断ができていない。さらに近年、軽度の高血糖時にインスリンを分泌する膵島β細胞量が減少していること、及び膵島β細胞は過度の障害を受けない限り再生する機構があることが報告されており、膵島β細胞数が減り始めた直後にそれを捉え適切な介入を行うことができれば、膵島β細胞数の回復・維持による糖尿病発症予防が可能と考えられている。このような考えに基づき、近年、膵島β細胞に着目した分子プローブ開発が注目されているが、膵島β細胞数の非侵襲的定量イメージングが可能なプローブはいまだ開発されていない。

これまで、膵島イメージングの可能性について探索する研究はあったが、膵島β細胞に高い選択性を有する分子は存在しなかった。また、膵島移植分野において、体外で膵島に標識を行ってから移植し、移植後の膵島を MRI や PET で追跡する論文は報告されているが、これは一旦体外に膵島を取り出すプロセスが必要であり、生体内の膵島定量化研究とは全く異なる。生体のままで非侵襲的に直径 50~500 μm 程度の小さな細胞塊である膵島組織を定量化するためには、膵島特異的に集積し、撮像機器が有する空間分解能と時間分解能にて識別可能な周囲組織とのコントラストを発生させることができる

プローブが必要である。そこで本研究では、糖尿病の予兆を早期かつ確定的に捉えるという超早期診断を目的として、膵臓β細胞の定量を可能とする PET/SPECT 用イメージングプローブを開発することとした。研究を進めるにあたり、まず SPECT プローブの開発を優先した。

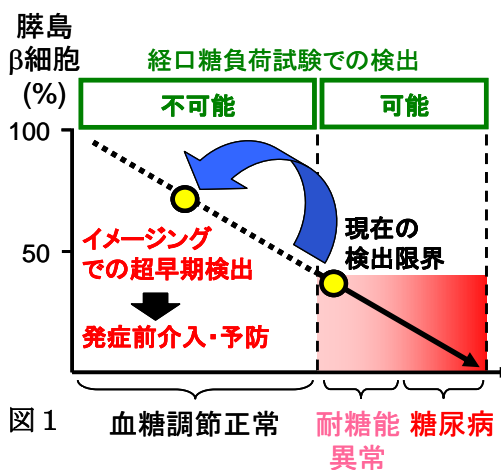


図 1

## **【方法】**

### **プローブの探索、設計・合成**

先ず、膵島細胞における標的分子の探索から開始した。これまでに開発されている糖尿病薬や、膵島β細胞内に存在し糖尿病時に変化を起こす因子を中心に探索を行い、標的分子の絞り込みを行った。その中でも特に、Glucagon-like peptide-1 受容体 (GLP-1R) に着目することとした。プローブの母格には、GLP-1R に高い親和性が報告されているペプチド性リガンドである Exendin(9-39) を母体化合物に選択した。Exendin はアメリカ毒トカゲ (Gila monster lizard) の唾液から分離され、ヒト活性型 GLP-1 とアミノ酸配列 53% を共有しており、GLP-1R に強く結合する。既に欧米では GLP-1 作動薬 (インクレチンミメティクス) として、エクセナチド (exenatide)、リラグルチド (liraglutide) が 2 型糖尿病薬として臨床応用されている。そこで本研究では、<sup>125</sup>I で標識した Exendin(9-39) 誘導体を設計、合成し、SPECT 用プローブとしての有用性を評価した。

### **In vitro 膵島親和性評価**

単離した膵島 100 μL に 20mM HEPES buffer (pH 7.4、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mg/mL bacitracin、1mg/mL BSA を含む、870 μL)、各濃度の非標識の評価用化合物水溶液 (0、10<sup>-12</sup>~10<sup>-6</sup> M、計 8 本、10 μL)、<sup>[125I]</sup>Bolton-Hunter Exendin-(9-39) 溶液 (20 μL) を加え懸濁し、60 分インキュベートした。インキュベート溶液を予め湿らせた GlassFiber filter GF/C を用いた吸引濾過により B/F 分離を行った。フィルターは氷水中で冷やした PBS (5mL) で 3 回洗浄しフィルターの放射能をガンマカウンターで測定した。

### **正常マウスにおける体内分布の評価**

<sup>[125I]</sup>IB12-Ex (9-39) をマウス (ddY 系雄性、6 週齢、各タイムポイント 5 匹) に 100 μL/匹で尾静脈より投与した。マウスは投与から適切な時間が経過後に断頭し、臓器 (膵臓、血液、心臓、肺、胃、腸、肝臓、脾臓、腎臓、首 (甲状腺)) を摘出した。臓器の重量を計量し、臓器中の放射能をガンマカウンターにて測定した。

### **前投与阻害による体内分布の評価**

<sup>[125I]</sup>IB12-Ex (9-39) をマウス (ddY 系雄性、6 週齢、前投与群 5 匹、コントロール 5 匹) に 100 μL/匹で尾静脈より投与した。前投与群には Exendin(9-39) の生理食塩水溶液 100 μL を標識体投与の 30 分前に投与した (50 μg/匹)。マウスは投与 30 分後に断頭し、臓器 (膵臓、血液、心臓、肺、胃、腸、肝臓、脾臓、腎臓、首 (甲状腺)) を摘出した。臓器の重量を計量し、臓器中の放射能をガンマカウンターにて測定した。

## Ex vivo オートラジオグラフィ

MIP-GFP マウス(インスリン遺伝子のプロモータに GFP をトランスジェニックした  $\beta$  細胞 GFP マウス)に  $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex(9-39)を尾静脈より投与した(100  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{Ci}$ /匹)。マウスは Hot 投与 30 分後に頸椎脱臼により屠殺した。心臓から生理食塩水を灌流して臓器を脱血し、膵臓を摘出した。摘出した膵臓を生理食塩水中で洗浄し、スライドガラス上にカバーガラスで圧着し標本を作製した。標本の蛍光物質分布を読み取り、標本の放射能を 24 時間露光し放射能分布を読み取った。

## 正常マウスでの SPECT 撮像

$[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex(9-39)をマウス(ddY 系雄性、5 週齢)に尾静脈より投与した。マウスは投与 30 分後から、低エネルギーピンホールコリメータ(LEPH:ピンホール径 50mm)を装着した SPECT-2000H スキャナにて、1 フレームあたり 40 秒で 32 フレームの SPECT 撮像を行った。

### 【結果・考察】

非標識の IB12-Ex(9-39)を用いて膵島細胞への親和性を評価したところ、母体となる Ex(9-39) ( $\text{IC}_{50} = 1.4 \text{ nM}$ )と同程度の高い親和性( $\text{IC}_{50} = 0.8 \text{ nM}$ )を有していた。

次に、 $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex(9-39) の正常マウス体内における経時的な放射能の分布を評価した結果、投与後早期から膵臓へ高く集積し、30 分後には 45.4%dose/g と最も高い集積を示した。また、脱ヨウ素の指標である首への集積が低かったことから、 $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex(9-39)は生体内で安定であることが示唆された。イメージングの観点から、膵臓近傍の臓器へは低集積な化合物がプローブとして有用であると考えられた。そこで、膵臓近傍の臓器で大きな体積を占める肝臓、腎臓に対する集積比を算出した。

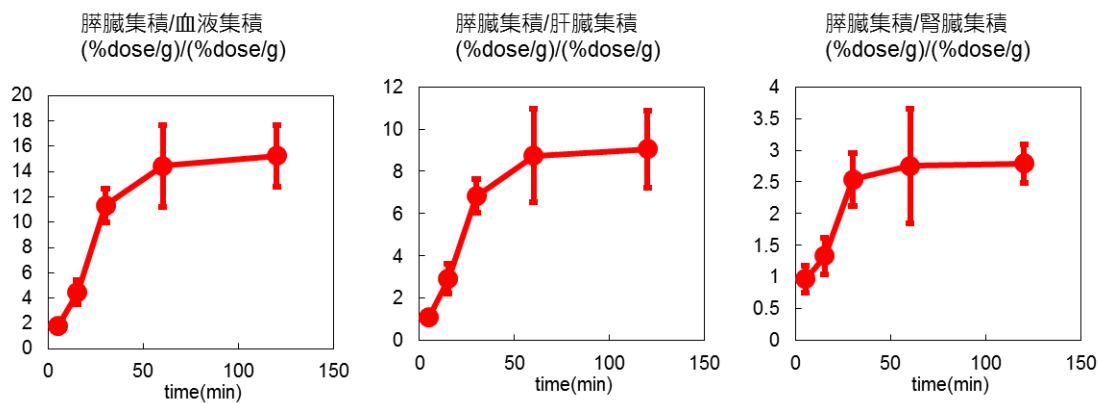
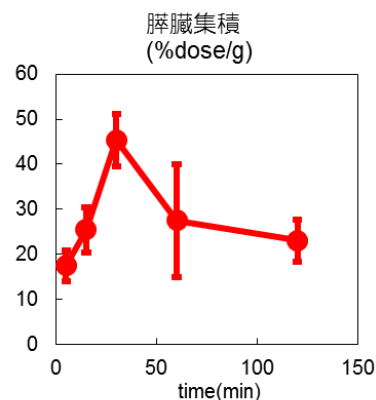


図 2

膵臓／肝臓比及び膵臓／腎臓比は経時的に高くなり、投与後 60 分以降でほぼ平衡に達した (図 2)。このように、 $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex (9-39) は膵臓への集積量が高く、かつ周辺臓器に対する膵臓への集積量の比率が高いことから、イメージングした際に、明瞭な膵臓の画像が得られることが示唆された。

更に、 $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex (9-39) のマウス体内での GLP-1R への結合を検討するため、過剰量の Ex (9-39) を前投与し GLP-1R を阻害したマウスにおける膵臓への放射能集積量の変化を評価した。前投与と阻害したマウスと対照群とを比較したところ、膵臓への集積量に有意な差を認め、その集積差は 92% であった。また、GLP-1R が高発現している肺においても集積量に有意な差を認めた (図 3)。従って、 $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex (9-39) 投与による膵臓への集積が主に GLP-1R への結合によるものであることが示唆された。

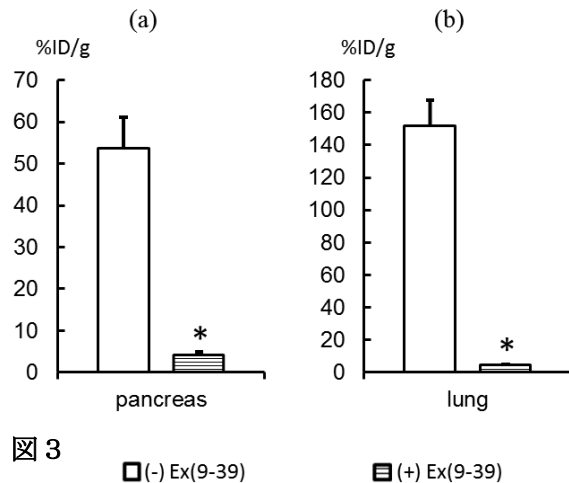


図 3

図 4 は、 $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex (9-39) を投与した MIP-GFP マウスの膵島切片の ex vivo autoradiography の結果を示す。放射性シグナルの局在性は、GFP シグナルと一致していたことから、 $[^{125}\text{I}]$ IB12-Ex (9-39) が、膵β細胞に特異的に集積することが確認できた。

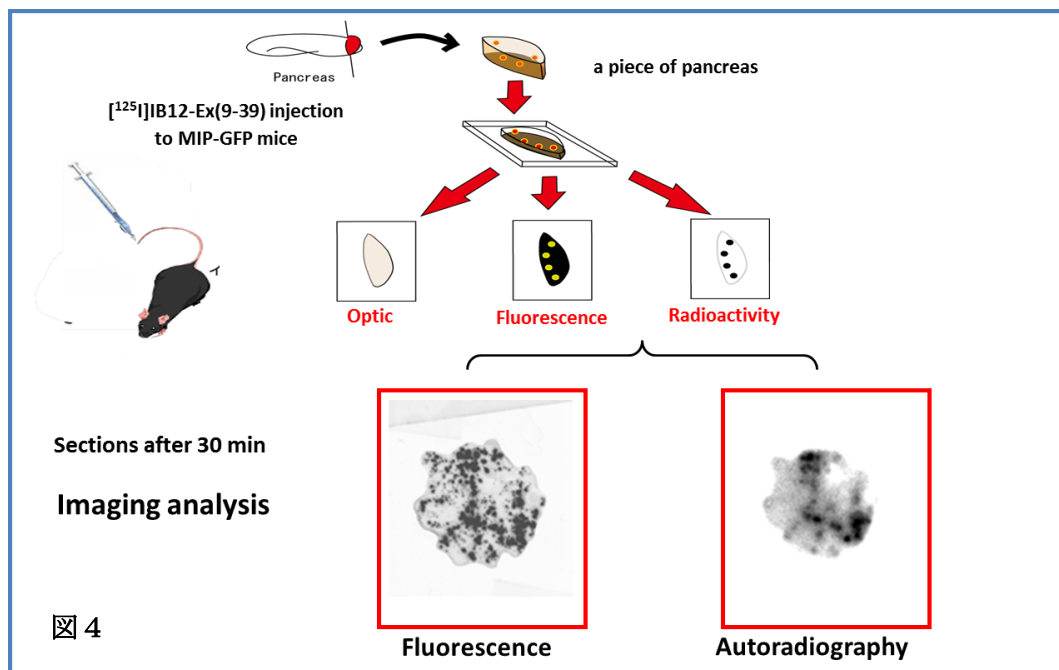


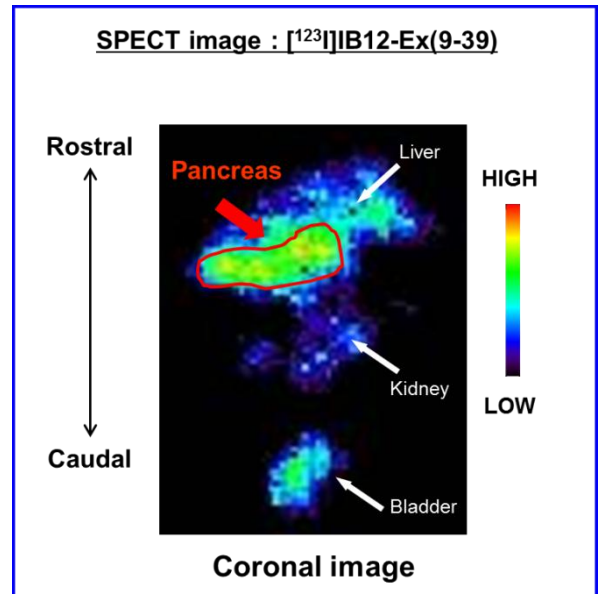
図 4

最後に、正常マウスに $[^{123}\text{I}]$ IB12-Ex(9-39)を投与して30分後にSPECT撮像を実施した。

図5の冠状断像 (coronal image) から分かるように、膵臓の明瞭な描出に成功した。また、近傍臓器である、肝臓、腎臓への放射能の集積は低かった。これは体内分布実験と一致する結果であった。

以上より、 $[^{123}\text{I}]$ IB12-Ex(9-39)は膵島 $\beta$ 細胞イメージングプローブの有望な候補化合物になりうることが示された。

図5



### 【まとめ】

本研究では、SPECT用の膵臓 $\beta$ 細胞GLP-1R結合型放射性プローブとしてのEx(9-39)誘導体の有用性、及び $[^{123}\text{I}]$ IB12-Ex(9-39)が膵臓 $\beta$ 細胞イメージングプローブになりうることを示された。

本研究を経て臨床において膵島量が定量できれば、糖尿病発症過程の病態が明らかとなり、膵島 $\beta$ 細胞数に基づく糖尿病超早期診断と発症前の予防的介入につながると考えられる。また、今回新たに開発する分子イメージング法は、膵島 $\beta$ 細胞数回復・維持を目的とする糖尿病治療薬開発のモニタリングや膵島移植後のフォローアップにも有効な方法になり得ると考えられることから、医薬品開発分野・医療分野において非常に意義深い成果が期待できる。

### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人医用原子力技術研究振興財団に心より御礼申し上げます。