

分子イメージングを用いた糖尿病治療薬の体内動態解析 及び薬効評価に関する研究

学位論文内容の要旨

糖尿病はインスリンの作用が不足することによって、血糖値が高い状態が持続する疾患である。糖尿病の進行に伴い、重篤な合併症を引き起こすことから、個々の患者に合わせた個別化治療が望まれる。個別化治療において有用な情報を得るためには、個々の患者における糖尿病治療薬の体内動態、病態及び治療効果を評価する必要がある。分子イメージングは、生体内における生命現象の分子及び細胞レベルのプロセスを生きた状態で可視化する技術であり、近年、個別化治療の実現において高く期待されている。本研究では、分子イメージングを用いた個別化治療を目指して、糖尿病治療薬の体内動態解析及び薬効評価に関する研究を行った。

1. 分子イメージングを用いた糖尿病治療薬の体内動態解析に関する研究:ガンマカメラを用いた糖鎖修飾 GLP-1 の組織分布解析

【背景及び目的】糖尿病治療薬として望まれている Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は、糖鎖修飾により血糖降下作用が向上することが糖尿病モデル動物において報告されている。本研究では、GLP-1 の体内動態に及ぼす糖鎖修飾の影響を精査することを目的に、ガンマカメラを用いて糖鎖修飾 GLP-1 の組織分布解析を実施した。

【対象及び方法】GLP-1 及び糖鎖修飾 GLP-1 の放射性ヨウ素標識は、クロラミン T 法により行った。 ^{123}I 標識 GLP-1 及び糖鎖修飾 GLP-1 をラットに尾静脈内投与し、ガンマカメラ (E-CAM, Siemens 社製) を用いて非侵襲的に撮像した後、得られた画像に関心領域を設定した。また、 ^{125}I 標識 GLP-1 及び糖鎖修飾 GLP-1 をラットに尾静脈内投与後、所定時間に血液及び組織を採取し、血漿中トリクロロ酢酸 (TCA) 不溶画分 (未変化体等の高分子成分) 及び組織中の放射能濃度を測定した。得られた測定値を用いて、投与後 60 分間の血漿中 TCA 不溶画分及び組織中放射能濃度の時間放射能曲線下面積 (AUC) 比を算出した。

【結果及び考察】 ^{123}I 標識 GLP-1 は肝臓に高く集積したが、 ^{123}I 標識糖鎖修飾 GLP-1 は ^{123}I 標識 GLP-1 と比べ、肝臓の AUC 比が 89%まで有意に低下した。これらの結果は ^{125}I 標識体による組織摘出法の結果とよく合致した。また、糖鎖修飾していないものと比べ、 ^{123}I 標識糖鎖修飾 GLP-1 の血漿中 TCA 不溶画分放射能の AUC 比は 1.7 倍有意に高く、肝臓への分布の低下が起因していると考えられた。

【小括】GLP-1 を糖鎖修飾することにより、代謝組織である肝臓への放射能の分布が有意に低下し、血漿中 TCA 不溶画分の放射能濃度が上昇した。

2. 分子イメージングを用いた糖尿病治療薬の薬効評価に関する研究: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識アネキシン A5 を用いた膵β細胞のアポトーシスイメージング

【背景及び目的】1 型糖尿病では病態の進行に伴い、膵β細胞が消失する。この膵β細胞の消失にはアポトーシスが関与していることから、膵β細胞のアポトーシスを非侵襲的に

検出できれば、糖尿病の早期診断及び治療効果評価に役立つと考えられる。しかしながら、臨床応用に適した画像化の試みは未だなされていない。本研究では、膵β細胞のアポトーシスの定量化における、アポトーシスのプローブである^{99m}Tc 標識アネキシン A5 の有用性を検証するために、1型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン (STZ) 処置マウス及び NOD マウスを用いて検討した。

【対象及び方法】Balb/c マウス (雄性, 10 週齢) に STZ (120 あるいは 200 mg/kg, n=5) を単回腹腔内投与することにより 1 型糖尿病モデルを作製した。また、自然発症型の 1 型糖尿病モデルとして、5, 9, 16 及び 20 週齢の雌性 NOD マウス (各週齢 n=5-8) を用いた。マウスに^{99m}Tc 標識アネキシン A5 (18.5 MBq/マウス) を静脈内投与し、投与した 6 時間後に膵臓を摘出し、膵臓の凍結切片を作製した後、オートラジオグラフィ、インスリン免疫染色及び TUNEL 染色を実施した。得られたデータを、膵ラ氏島の面積で補正した放射能 (%ID*10E6/mm²/kg) あるいは TUNEL 陽性細胞数 (cells/mm²) で表示した。

【結果及び考察】STZ (200 mg/kg) 処置マウスの膵ラ氏島に対する^{99m}Tc 標識アネキシン A5 の集積量は対照マウスに比べ、有意に高かった (2.5 ± 0.7 vs 0.7 ± 0.1 %ID*10E6/mm²/kg, p<0.01)。NOD マウスを用いた検討において、^{99m}Tc 標識アネキシン A5 の膵ラ氏島への集積は、16 週齢の NOD マウスにおいて最も高く、16 週齢の NOD マウスの膵ラ氏島に対する^{99m}Tc 標識アネキシン A5 の集積量は 5 週齢の NOD マウスに比べ、有意に高かった (1.1 ± 0.4 vs 0.5 ± 0.1 %ID*10E6/mm²/kg, p<0.01)。TUNEL 陽性細胞は STZ (200 mg/kg) 処置マウスの膵ラ氏島において多く観察され、STZ (200 mg/kg) 処置マウスの膵ラ氏島における TUNEL 陽性細胞数は対照マウスに比べ、有意に多かった (1170 ± 535 vs 5 ± 6 cells/mm², p<0.01)。NOD マウスを用いた検討において、TUNEL 陽性細胞は、16 週齢の NOD マウスの膵ラ氏島に多く観察され、5 週齢の NOD マウスに比べ有意に多かった (152 ± 82 vs. 4 ± 9 cells/mm², p<0.05)。さらに、STZ 処置マウス及び NOD マウスにおいて、膵ラ氏島における^{99m}Tc 標識アネキシン A5 の集積量は、TUNEL 陽性細胞数と正の相関を示した (STZ 処置マウス: r=0.821, p<0.001, NOD マウス: r=0.721, p<0.001)。

【小括】^{99m}Tc 標識アネキシン A5 は、アポトーシスを惹起した 1 型糖尿病モデルマウスの膵ラ氏島に高く集積し、その集積量は TUNEL 陽性細胞数と正の相関を示した。

【結論】第 1 の研究では、GLP-1 を糖鎖修飾することにより、代謝組織である肝臓への放射能の分布が有意に低下し、血漿中 TCA 不溶画分の放射能濃度が上昇することを示した。これらの結果から、糖尿病モデル動物における糖鎖修飾 GLP-1 の血糖降下作用の機序を部分的に説明できるとともに、糖鎖修飾はペプチドの肝移行を回避するために有用な手段であると考えられる。第 2 の研究では、^{99m}Tc 標識アネキシン A5 は、アポトーシスを惹起した糖尿病モデルマウスの膵ラ氏島に高く集積することを示した。この結果から、^{99m}Tc 標識アネキシン A5 は 1 型糖尿病に起因する膵β細胞のアポトーシスを検出できるプローブとして有用である可能性が示された。以上の研究結果から、分子イメージングを用いて、糖尿病治療薬の体内動態解析及び薬効評価を行い、生きた状態で医薬品の薬効機序の解明及び糖尿病の病態を評価できる可能性を示した。今後、分子イメージングを用いて、糖尿病治療薬の体内動態、病態及び治療効果を評価することにより、糖尿病の個別化治療において有用な情報を提供できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	三輪	聡一
副査	教授	久下	裕司
副査	教授	趙	松吉
副査	教授	石川	正純

学位論文題名

分子イメージングを用いた糖尿病治療薬の体内動態解析 及び薬効評価に関する研究

申請者は、論文の前半では、分子イメージングを用いた糖尿病治療薬の体内動態解析に関する研究を行い、GLP-1 を糖鎖修飾することにより、代謝組織である肝臓への放射能集積が有意に低下し、血漿中 TCA 不溶画分の放射能濃度が上昇することを示した。この結果から、糖尿病モデル動物における糖鎖修飾 GLP-1 の血糖降下作用の機序を部分的に説明するとともに、糖鎖修飾はペプチドの肝移行を回避するために有用な手段であると述べた。論文の後半では、分子イメージングを用いた糖尿病治療薬の薬効評価に関する研究を行い、 ^{99m}Tc 標識アネキシン A5 がアポトーシスを惹起した 1 型糖尿病モデルマウスの膵ラ氏島に高く集積することを示した。この結果から、 ^{99m}Tc 標識アネキシン A5 は 1 型糖尿病に起因する膵 β 細胞のアポトーシスを検出できるプローブとして有用であると述べた。上記の研究成果より、分子イメージングを用いて、糖尿病治療薬の体内動態、診断及び薬効評価を実施することにより、糖尿病における創薬研究及び個別化治療に有用な情報を提供できると報告した。

石川教授から、ペプチドの放射標識に ^{123}I 及び ^{125}I を用いた理由を問われ、 ^{123}I 及び ^{125}I の半減期はそれぞれ約 13 時間及び約 60 日であり、実験時間の制限があることから、*in vivo* イメージングには ^{123}I を用い、組織摘出法には ^{125}I を代用したと回答した。また、小動物 PET/SPECT/CT 装置 (Inveon (SIEMENS 社)) を用いた膵 β 細胞のアポトーシスの *in vivo* イメージングの実現可能性について問われ、マウス膵臓の画像化における感度不足の懸念があること、 ^{99m}Tc 標識アネキシン A5 は膵臓の周辺組織 (肝臓、腎臓及び脾臓) に高く集積することから、 ^{99m}Tc 標識アネキシン A5 を用いたマウスの検討は困難であり、他のアポトーシスプローブによる実現可能性を検討する必要があると回答した。

趙教授から、GLP-1 の糖鎖修飾による肝臓集積の低下率及び薬効向上の関係について質問があり、体内動態解析及び薬効評価に用いたペプチドの投与量を同じに設定したことから、本研究で得られた肝臓集積の低下率が薬効向上の程度を反映していると推察されるが、実験動物の種差 (体内動態解析: ラット, 薬効評価: マウス) があることから、今後の検討課題として確認する必要があると回答した。また、糖鎖修飾 GLP-1 の選択について問われ、本研究に用いた糖鎖修飾 GLP-1

は糖鎖1つの修飾体の中で薬効が最も向上した修飾体であり、糖鎖2つの修飾体と比べ薬効が劣ると既報に報告されているが、実験必要量の確保も考慮し、総合的に本修飾体を選択したと回答した。

三輪教授から、肝臓における GLP-1 の結合様式について質問があり、GLP-1 の結合様式には、GLP-1 受容体への特異的結合及び脂溶性などの非特異的結合があり、さらに糖鎖修飾は特異的結合には影響を与えることなく、非特異的結合を低下させると考えられることから、GLP-1 の糖鎖修飾による肝臓集積の低下は非特異的結合の低下が要因であると回答した。また、GLP-1 の排泄機序について問われ、GLP-1 は分子量が約 3300 Da であることから、腎排泄（糸球体ろ過）を介した尿排泄が主であり、本実験において腎臓における残留は観察されなかったと回答した。また、マウスに ^{99m}Tc 標識アネキシン A5 を投与した後の膵臓摘出の時点設定についての指摘があり、本研究では既報を基に1時点（6時間）を設定したが、アポトーシスの頻度及びプローブの集積のバランスを考慮し、評価に適した時間を設定するためには、他の時点も検討する必要がある、今後の検討課題とすると回答した。

久下教授から、1型糖尿病患者における膵β細胞のアポトーシスの評価時期について問われ、1型糖尿病患者における膵β細胞のアポトーシスの頻度は疾患モデルマウスと比べ、少ない可能性があり、1型糖尿病患者の *in vivo* イメージングにおける重要な課題であると回答した。また、三輪教授と同じく、マウスに ^{99m}Tc 標識アネキシン A5 を投与した後の膵臓摘出の時点設定についての指摘があり、今後、膵β細胞のアポトーシスを評価するための最適な時点を検討する必要があると回答した。

本論文の前半は *Annals of Nuclear Medicine* 誌にて高く評価され、後半は *Journal of Nuclear medicine* 誌にて査読中であるが、1型糖尿病の診断及び治療に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。