Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Positron emission tomography study on pancreatic somatostatin receptors in normal and diabetic rats with ^{68}Ga-DOTA-octreotide: A potential PET tracer for beta cell mass…

Sako, Takeo

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第5998号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005998

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Positron emission tomography study on pancreatic somatostatin receptors in normal and diabetic rats with ^{68}Ga-DOTA-octreotide: A potential PET tracer for beta cell mass measurement

膵β細胞量測定用 PET 診断薬となり得る ^{68}Ga-DOTA-octreotide を用いた、健常ラットおよび糖尿病ラットにおける膵ソマトスタチン受容体 PET イメージング研究

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
放射線医学分野　分子イメージング学
（指導教員：千田道雄　客員教授）

佐　古　健　生

要旨

1. 背景と研究目的

糖尿病は高血糖を特徴とする代謝性疾患であり、インスリンの分泌不全やインスリンの作用不足により引き起こされる。近年、インスリンを分泌する膵β細胞の減少や機能不全が、所々の臨床所見や高血糖が出現する前から起こっていることが相次いで報告されており、β細胞量は、糖尿病の早期発見や治療にとって重要なバイオマーカーと考えられている。

しかし、現在行われている唯一のβ細胞量の測定法は生検であり、侵襲性が強いため、糖尿病の発症前や発症早期に検査を行うことや、治療効果あるいは病態の進行をモニタリングするため経時的に検査を繰り返すことは困難である。従って、侵襲性の低いβ細胞量測定法の開発は、早期発見や早期治療、治療効果の判定などにつながると期待されている。

一方、近年のイメージング技術の向上とケミカルバイオロジーの進歩により、生体内における機能分子の時間的・空間的・量的変化を非侵襲的に知ることが可能となってきた。様々なイメージング機器の中で、陽電子放射断層撮像法（Positron emission tomography, PET）は、被検体から放出されるガンマ線を体外で計測するため、侵襲性が低く、高感度で定量性が高いという特徴がある。このため、これまでにβ細胞量測定用の PET プローブがいくつか開発されてきたが、いまだ診断薬として確立されたものはない。

そこで、β細胞量を評価するために、我々はβ細胞に高度に発現しているソマトスタチン受容体に着目した。ソマトスタチンはβ細胞やその他の膵内分泌細胞に作用し、インスリンをはじめとする膵内分泌ホルモンの分泌を制御する重要なレギュレーターと考えられている。膵内分泌細胞からなるランゲルハンス島において、げっ歯類ではβ細胞が 60-70％と多数を占めており、そのソマトスタチン受容体の発現は、β細胞量測定に対するバイオマーカーとなり得る。

本研究では、ソマトスタチンの代謝耐性アナログである octreotide に、bifunctional chelator と呼ばれる機能性分子である 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- tetraacetic acid (DOTA)を導入し、放射性核種である ^{68}Ga で標識した ^{68}Ga-DOTA-octreotide を PET プローブとして用い、健常ラット及び糖尿病モデルラットで PET 撮像を行って、β細胞量で評価できる可能性を探ることを目的としている。

2. 方法

2-1 ^{68}Ga-DOTA-octreotide の合成

DOTA-octreotide は標準的な固相合成法により合成した。^{68}Ga による放射能標識は、Zhernosekov らによって既に報告されている既知の方法を用いて行った。すなわち、市販の ^{68}Ge/^{68}Ga ジェネレーターから溶出させた ^{68}Ga を陽イオン交換カラムによって精製し、HEPES 緩衝液に溶解させた DOTA-octreotide を加え、反応液の pH を 3.5 に調整した。これをマイクロウェーブで 140℃・15 分間反応させた後、カラムを通して精製し、最終的な目的物である PET プローブ、^{68}Ga-DOTA-octreotide を得た。

2-2 動物の準備

8-9 週齢のオスの Sprague-Dawley ラットで体重がおよそ 250 グラムのものを用いた。PET 撮像前には、1.5%のイソフルレン麻酔下で投与用の静脈ルートを尾静脈に確保し、ラットを PET カメラのガントリー内に固定した。撮像中は体温測定プローブを肛門に挿入し、体温をモニターしながら体温調節器によって体温が 37℃に保たれるようにした。

糖尿病モデルの作成には、ラット体重あたり 70mg/kg のストレプトゾトシン（STZ）を腹腔内に投与して β 細胞を選択的に破壊した。STZ 投与後 15 日の血糖値は 457±16.9mg/dl（健常群は 116±6.47mg/dl）と高血糖を示した。

2-3 PET 撮像

全ての PET 実験は動物用の PET カメラを用いて行った。1.5%イソフルレン麻酔下でラットを PET カメラのガントリーに固定し、^{68}Ge-^{68}Ga 線源を用いて減弱補正用のトランスミッションスキャンを 30 分行い、次いで PET プローブを投与して 90 分間の腹部スキャンを行った。PET プローブの放射能投与量は 25.7±2.77MBq であった。また、物質としての投与量（マスドース）は 1.26±0.14μg であった。

また、^{68}Ga-DOTA-octreotide の集積がソマトスタチン受容体との特異的な結合によるものかどうかを検証するため、非標識の octreotide を過剰量投与してブロッキング実験を行った。約 1000 倍の非標識体を投与して受容体をブロックした後、1 分後に PET プローブの投与を行った。対照には同量の生理食塩水のみを投与した。

PET 画像の画像再構成には、定量性に優れた数学的な再構成法である Filtered back-projection 法（FBP 法）と、画質に優れた統計学的な再構成法である Maximum a posteriori 法（MAP 法）を用いた。PET 画像解析は専用ソフトを用いて行った。3 次元的な関心領域（Volumetric region of interest, VOI）の設定には MAP 法による画像を用い、その VOI を FBP 法画像に載せて放射能集積値を抽出しその時間経過（Time-activity curve）を得た。臓器当たりの集積を示す割合（% injected dose, %ID）の算出は、動物の体重と PET プローブの投与量によって補正を行い、正規化した。

2-4 Ex vivo biodistribution 実験

全ての PET 撮像後、PET プローブ投与後 120 分で動物を安楽死させ、生理食塩水で灌流した後、臓器と組織を摘出した。それぞれの試料はガンマカウンタで放射活性を測定し、時間による減衰の補正を加えて、投与 PET プローブ量に対する割合を組織重量 1g あたりで（%ID/g）算出した。

2-5 データ分析

データは平均±標準誤差で示してある。異なる群の有意差を明らかにするために t 検定を用い、有意水準を 5%とした。

3. 結果

3-1 健常ラット膵における ^{68}Ga-DOTA-octreotide の集積

健常なラットでは、膀胱と腎に高い集積が認められた他、膵にもはっきりとした集積が認められた一方、肝では集積が弱かった。膵と肝の Time-activity curve によると、膵では投与後 1 分以内に急激な放射活性の上昇を認め、その後も徐々に増加してゆき、撮像終了時（投与後 90 分）には 0.99±0.24%ID に達した。対照的に、肝では投与後 15 秒でピークに達し、その後は急速に減少して撮像終了時には 0.17±0.08%ID に過ぎなかった。薬物の排泄に関わる臓器である、腎と膀胱ではかなり高い集積が認められ、撮像終了時には前者は 1.64±0.58%ID、後者は 12.8±0.63%ID を示した。

3-2 非標識 otreotide を用いたブロッキング実験における膵集積

膀胱・腎・肝では ^{68}Ga-DOTA-octreotide の集積が認められたが、解剖学的に膵があるべき場所には集積が認められなかった。ex vivo biodistribution のデータにおいても、膵での集積は有意に減少しており、放射活性は対照群のわずかに 3.49%に過ぎなかった。

3-3 STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける膵集積の減少

^{68}Ga-DOTA-octreotide の膵での集積が β 細胞量の変化を表すかどうかを調べるため、STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いて PET 撮像を行った。PET 画像は膵集積の減少を示し、ex vivo biodistribution のデータでは健常ラットの 47.3%の放射活性を示し、有意な減少を認めた。

4. 考察

本研究では、^{68}Ga-DOTA-octreotide を用いた PET 撮像によりβ細胞量の評価が可能かどうかを健常ラットおよび糖尿病モデルラットにおいて検証し、^{68}Ga-DOTA-octreotide が糖尿病の診断や治療効果の判定に対する診断薬になり得る可能性を示した。

これまで、β細胞量測定のためにいくつかの PET プローブが開発されてきた。それらはβ細胞に対して親和性や選択性がよいにもかかわらず、in vivo でのイメージングにおいて十分な可能性を示すことができたものはごく少数であった。例えば、vesicular monoamine transporter 2 をターゲットとする[^{11}C]DTBZ や[^{18}F]FP-(+)-DTBZ はβ細胞量測定用 PET プローブとして報告されているが、肝への高い集積がβ細胞量の過大評価をもたらす可能性がある。しかも、膵外分泌細胞への非特異的な集積も報告されている。対照的に、^{68}Ga-DOTA-octreotide は腎への高い集積を考慮する必要があるものの、肝やその他の膵近傍の消化管よりも膵集積がはるかに高い。特に、DTBZ 由来の PET プローブに比べて肝集積が低い点は、肝内の移植膵島を評価する場合のよいツールと成り得る。

一方、放射性ソマトスタチンアナログはこれまでいくつか報告されてきたが、これらはソマトスタチン受容体を発現している神経内分泌腫瘍の検索や治療のために利用されてきた。^{111}In-DTPA-octreotide (Octreoscan®)は商業的に入手可能で（ただし、日本では現時点で未承認）、シンチグラフィや単一光子放射断層撮像（Single photon emission computed tomography, SPECT）の診断薬であり、神経内分泌腫瘍やソマトスタチン受容体を発現しているその他の腫瘍の検知・検出のために、最も一般的に利用されている薬剤である。また近年は陽電子放出核種で標識された PET 用の放射性ソマトスタチンアナログも報告されてきたが、これらはいずれも膵β細胞の測定用ではなく、あくまでもソマトスタチン受容体発現腫瘍に対するものであった。本研究は、ソマトスタチンアナログが膵β細胞量の PET 測定に利用できる可能性を初めて示した点に意義がある。なお、^{111}In-SPECT の画質と定量性は PET に及ばないので、市販の Octreoscan®をヒトでの膵β細胞量の測定に用いることは難しいと考えられる。

結論として、健常ラットにおいて ^{68}Ga-DOTA-octreotide が膵に高集積を示すのは、ソマトスタチン受容体との特異的な結合であることを我々は論証した。STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける PET 画像と ex vivo biodistribution のデータは、^{68}Ga-DOTA-octreotide の膵への集積がβ細胞量を反映することを示した。よって、^{68}Ga-DOTA-octreotide はβ細胞量を評価する PET 診断薬と成り得る可能性を持つ。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲　第２３８９号	氏　名	佐古　健生
論文題目 Title of Dissertation	Positron emission tomography study on pancreatic somatostatin receptors in normal and diabetic rats with ^{68}Ga-DOTA-octreotide: A potential PET tracer for beta cell mass measurement 膵β細胞量測定用 PET 診断薬となり得る ^{68}Ga-DOTA-octreotide を用いた、健常ラットおよび糖尿病ラットにおける膵ソマトスタチン受容体 PET イメージング研究		
審査委員 Examiner	主　査　横崎　宏 Chief Examiner 副　査　的崎　尚 Vice-examiner 副　査　杉村　和朗 Vice-examiner		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

糖尿病は高血糖を特徴とする代謝性疾患であり、インスリンの分泌不全やインスリンの作用不足により引き起こされる。近年、インスリンを分泌する膵β細胞の減少や機能不全が、所々の臨床所見や高血糖が出現する前から起こっていることが相次いで報告されており、β細胞量は、糖尿病の早期発見や治療にとって重要なバイオマーカーと考えられている。しかし、現在行われている唯一のβ細胞量の測定法は生検であり、侵襲性が強いため、糖尿病の発症前や発症早期に検査を行うことや、治療効果あるいは病態の進行をモニタリングするため経時的に検査を繰り返すことは困難である。従って、侵襲性の低いβ細胞量測定法の開発は、早期発見や早期治療、治療効果の判定などにつながると期待されている。一方、近年のイメージング技術の向上とケミカルバイオロジーの進歩により、生体内における機能分子の時間的・空間的・量的変化を非侵襲的に知ることが可能となってきた。様々なイメージング機器の中で、陽電子放射断層撮像法（positron emission tomography, PET）は、被検体から放出されるガンマ線を体外で計測するため、侵襲性が低く、高感度で定量性が高いという特徴がある。このため、これまでにβ細胞量測定用の PET プローブがいくつか開発されてきたが、いまだ診断薬として確立されたものはない。そこで、β細胞量を評価するために、β細胞に高度に発現しているソマトスタチン受容体に着目した。ソマトスタチンはβ細胞やその他の膵内分泌細胞に作用し、インスリンをはじめとする膵内分泌ホルモンの分泌を制御する重要なレギュレーターと考えられている。膵内分泌細胞からなるランゲルハンス島において、げっ歯類ではβ細胞が 60-70%と多数を占めており、そのソマトスタチン受容体の発現は、β細胞量測定に対するバイオマーカーとなり得る。本研究では、ソマトスタチンの代謝耐性アナログである octreotide に、bifunctional chelator と呼ばれる機能性分子である 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- tetraacetic acid (DOTA)を導入し、放射性核種である ^{68}Ga で標識した ^{68}Ga-DOTA-octreotide を PET プローブとして用い、健常ラット及び糖尿病モデルラットで PET 撮像を行って、β細胞量で評価できる可能性を探索した。

得られた結果は以下のごとくである。

（１）健常ラットでは、膀胱と腎に高い集積が認められた他、膵にもはっきりとした集積が認められた一方、肝では集積が弱かった。膵と肝の Time-activity curve によると、膵では投与後 1 分以内に急激な放射活性の上昇を認め、その後も徐々に増加してゆき、撮像終了時（投与後 90 分）には 0.99 ± 0.24%ID に達した。対照的に、肝では投与後 15 秒でピークに達し、その後は急速に減少して撮像終了時には 0.17 ± 0.08%ID に過ぎなかった。薬物の排泄に関わる臓器である、腎と膀胱ではかなり高い集積が認められ、撮像終了時には前者は 1.64 ± 0.58%ID、後者は 12.8±0.63%ID を示した。

（２）非標識 otreotide を用いたブロッキング実験では、膀胱・腎・肝に ^{68}Ga-DOTA-octreotide 集積が認められたが、解剖学的に膵があるべき場所には集積が認められなかった。*Ex vivo* biodistribution のデータにおいても、膵での集積は有意に減少しており、放射活性は対照群のわずかに 3.49%に過ぎなかった。

（３）^{68}Ga-DOTA-octreotide の膵での集積がβ細胞量の変化を表すかどうかを調べるため、STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いて PET 撮像を行った。PET 画像は膵集積の減少を示し、*ex vivo* biodistribution のデータでは健常ラットの 47.3%の放射活性を示し、有意な減少を認めた。

これまで、β細胞量測定のためにいくつかの PET プローブが開発されてきた。それらはβ細胞に対して親和性や選択性がよいにもかかわらず、*in vivo* でのイメージングにおいて十分な可能性を示すことができたものはごく少数であった。^{68}Ga-DOTA-octreotide は腎への高い集積を考慮する必要があるものの、肝やその他の膵近傍の消化管よりも膵集積がはるかに高い。本研究により、健常ラットで ^{68}Ga-DOTA-octreotide が膵に高集積を示すのは、ソマトスタチン受容体との特異的な結合であることが示され、STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける PET 画像と *ex vivo* biodistribution のデータは、^{68}Ga-DOTA-octreotide の膵への集積がβ細胞量を反映することを示した。従って、^{68}Ga-DOTA-octreotide はβ細胞量を評価する PET 診断薬と成り得る可能性を持つことが示唆された。

本研究は糖尿病早期診断指標となることが期待される膵β細胞量を ^{68}Ga-DOTA-octreotide を用いた PET 撮像によりソマトスタチン受容体発現量を計測することにより推測することの可能性を証明したものであるが、従来殆ど行われなかった画像診断による膵島機能評価法の開発について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。