

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5437630号
(P5437630)

(45) 発行日 平成26年3月12日 (2014. 3. 12)

(24) 登録日 平成25年12月20日 (2013. 12. 20)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 51/00 (2006. 01)	A 6 1 K 49/02 C
G 0 1 N 33/60 (2006. 01)	G 0 1 N 33/60 Z

請求項の数 39 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2008-519393 (P2008-519393)	(73) 特許権者	306018457
(86) (22) 出願日	平成18年6月21日 (2006. 6. 21)		ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・
(65) 公表番号	特表2009-512625 (P2009-512625A)		ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・オブ
(43) 公表日	平成21年3月26日 (2009. 3. 26)		・ニューヨーク
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/024049		アメリカ合衆国・ニューヨーク・1 0 0 2
(87) 国際公開番号	W02007/005283		7・ニュー・ヨーク・ウエスト・ワンハン
(87) 国際公開日	平成19年1月11日 (2007. 1. 11)		ドレッドシックスティーンズ・ストリート
審査請求日	平成21年6月22日 (2009. 6. 22)		・ 5 3 5
(31) 優先権主張番号	60/695, 741	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成17年6月29日 (2005. 6. 29)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型糖尿病における膵臓内分泌部及びβ細胞集団を撮像するためのDTBZの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の膵臓におけるβ細胞集団を定量化する方法であって：

(a) 有効量の小胞モノアミントランスポーター2型 (vesicular monoamine transporter type 2: VMAT2) -特異的放射性リガンドを投与された対象の膵臓の少なくとも一部について取得された少なくとも1のコンピュータ化画像を用意する工程；及び、

(b) 前記コンピュータ化画像を定量分析し、前記対象の膵臓におけるβ細胞集団の定量的な測定値を取得する工程を含み、

前記放射性リガンドが [11C] DTBZである方法。

【請求項 2】

前記コンピュータ化画像が陽電子放出断層撮影 (positron emission tomography: PET) を用いて取得される、請求項1の方法。

【請求項 3】

前記対象が哺乳類である、請求項1の方法。

【請求項 4】

前記対象がヒトである、請求項1の方法。

【請求項 5】

対象における代謝障害の存在を決定する方法であって：

(a) 有効量の小胞モノアミントランスポーター2型 (VMAT2) -特異的放射性リガンドを投与された対象の膵臓の少なくとも一部について取得された少なくとも1のコンピ

10

20

ュータ化画像を用意する工程；

(b) 前記コンピュータ化画像を定量分析し、前記対象の膵臓におけるβ細胞集団の定量的な測定値を取得する工程；及び

(c) 前記β細胞集団の定量的な測定値をβ細胞集団の基準測定値と比較し、β細胞集団の定量的な測定値が前記基準測定値に対して有意に減少又は増加している場合に、代謝障害が存在すると決定する工程を含み、

前記放射性リガンドが[11C]DTBZである方法。

【請求項6】

前記コンピュータ化画像が陽電子放出断層撮影(PET)を用いて得られる、請求項5の方法。

10

【請求項7】

前記対象が哺乳類である、請求項5の方法。

【請求項8】

前記対象がヒトである、請求項5の方法。

【請求項9】

前記障害が膵臓β細胞関連障害である、請求項5の方法。

【請求項10】

前記障害がインスリノーマである、請求項9の方法。

【請求項11】

前記障害が糖尿病である、請求項9の方法。

20

【請求項12】

前記障害が1型糖尿病である、請求項11の方法。

【請求項13】

前記障害が2型糖尿病である、請求項11の方法。

【請求項14】

前記障害が前臨床1型糖尿病である、請求項5の方法。

【請求項15】

対象が糖尿病を発症するおそれを決定する方法であって、周期的な工程として：

(a) 有効量の小胞モノアミントランスポーター2型(VMAT2)－特異的放射性リガンドを投与された対象の膵臓の少なくとも一部について取得された少なくとも1のコンピュータ化画像を用意する工程；

30

(b) 前記コンピュータ化画像を定量分析し、前記対象の膵臓におけるβ細胞集団の定量的な測定値を取得する工程；及び

(c) 前記周期的に決定されるβ細胞集団の定量的な測定値をβ細胞集団の基準測定値と比較し、β細胞集団の定量的な測定値が前記基準測定値に対して有意に減少している場合に、前臨床糖尿病から糖尿病に進行するおそれがあると決定する工程を含み、

前記放射性リガンドが[11C]DTBZである方法。

【請求項16】

前記コンピュータ化画像が陽電子放出断層撮影(PET)を用いて得られる、請求項15の方法。

40

【請求項17】

前記対象が哺乳類である、請求項15の方法。

【請求項18】

前記対象がヒトである、請求項15の方法。

【請求項19】

代謝障害を処置又は予防するための治療の成否を決定する方法であって、周期的な工程として：

(a) 有効量の小胞モノアミントランスポーター2型(VMAT2)－特異的放射性リガンドを投与された対象の膵臓の少なくとも一部について取得された少なくとも1のコンピュータ化画像を用意する工程；

50

(b) 前記コンピュータ化画像を定量分析し、前記対象の膵臓におけるβ細胞集団の定量的な測定値を取得する工程；及び

(c) 前記周期的に決定されるβ細胞集団の定量的な測定値をβ細胞集団の基準測定値と比較し、β細胞集団の定量的な測定値が前記基準測定値に概ね一致している場合に、前記代謝障害を処置又は予防する治療に成功していると決定する工程を含み、前記放射性リガンドが〔11C〕DTBZである方法。

【請求項20】

前記コンピュータ化画像が陽電子放出断層撮影（PET）を用いて得られる、請求項19の方法。

【請求項21】

前記対象が哺乳類である、請求項19の方法。

【請求項22】

前記対象がヒトである、請求項19の方法。

【請求項23】

前記障害が膵臓β細胞関連障害である、請求項19の方法。

【請求項24】

前記障害がインスリノーマである、請求項19の方法。

【請求項25】

前記障害が糖尿病である、請求項19の方法。

【請求項26】

前記障害が1型糖尿病である、請求項25の方法。

【請求項27】

前記障害が前臨床1型糖尿病である、請求項19の方法。

【請求項28】

糖尿病を処置又は予防するための更なる治療の必要性を決定する方法であって、周期的な工程として：

(a) 有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMAT2）-特異的放射性リガンドを投与された対象の膵臓の少なくとも一部について取得された少なくとも1のコンピュータ化画像を用意する工程；

(b) 前記コンピュータ化画像を定量分析し、前記対象の膵臓におけるβ細胞集団の定量的な測定値を取得する工程；及び

(c) 前記周期的に決定されるβ細胞集団の定量的な測定値をβ細胞集団の基準測定値と比較し、β細胞集団の定量的な測定値が前記基準測定値に対して有意に減少している場合に、糖尿病を処置又は予防するための更なる治療が必要であると決定する工程を含み、前記放射性リガンドが〔11C〕DTBZである方法。

【請求項29】

前記コンピュータ化画像が陽電子放出断層撮影（PET）を用いて得られる、請求項28の方法。

【請求項30】

前記対象が哺乳類である、請求項28の方法。

【請求項31】

前記対象がヒトである、請求項28の方法。

【請求項32】

前記糖尿病が1型糖尿病である、請求項28の方法。

【請求項33】

対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するために使用されるキットであって、有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMAT2）-特異的放射性リガンドと、医薬的に許容し得る担体と、任意によりPETスキャナーとを含み、前記放射性リガンドが〔11C〕DTBZであるキット。

【請求項34】

前記対象が哺乳類である、請求項 3 3 のキット。

【請求項 3 5】

前記対象がヒトである、請求項 3 3 のキット。

【請求項 3 6】

対象における神経内分泌障害の存在を決定する方法であって：

(a) 有効量の小胞モノアミントランスポーター 2 型 (VMA T 2) - 特異的放射性リガンドを投与された対象の関心領域の少なくとも一部について取得された少なくとも 1 のコンピュータ化画像を用意する工程；

(b) 前記コンピュータ化画像を定量分析し、前記対象の膵臓における β 細胞集団の定量的な測定値を取得する工程；及び

(c) 前記 β 細胞集団の定量的な測定値を β 細胞集団の基準測定値と比較し、 β 細胞集団の定量的な測定値が前記基準測定値に対して有意に減少又は増加している場合に、神経内分泌障害が存在すると決定する工程を含み、前記放射性リガンドが [1 1 C] D T B Z である方法。

10

【請求項 3 7】

前記神経内分泌障害が神経内分泌ガンである、請求項 3 6 の方法。

【請求項 3 8】

神経内分泌腫瘍を撮像する方法であって、有効量の小胞モノアミントランスポーター 2 型 (VMA T 2) - 特異的放射性リガンドを投与された対象の関心領域の少なくとも一部について、少なくとも 1 のコンピュータ化画像を取得する工程を含み、前記放射性リガンドが [1 1 C] D T B Z である方法。

20

【請求項 3 9】

前記腫瘍が前立腺腫瘍である、請求項 3 8 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は N I H 認可番号 R O 1 D K 6 3 5 6 7 - 0 2 に基づく政府支援下でなされたものである。従って米国政府は本発明につき一定の権利を有する。

【0 0 0 2】

本発明は、対象における β 細胞集団を定量的に測定するための非侵襲的な方法であって、糖尿病等の代謝障害の管理に有用な方法に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

1 型糖尿病 (Type 1 Diabetes : T 1 D) は、膵臓の内分泌部位であるランゲルハンス島のインシュリン産生 β 細胞が、自己免疫により破壊される結果生じる (Weir, et al, 1990, Islet mass and function in diabetes and transplantation, Diabetes 39:401-405)。本疾患は尿崩症として発症し、認識されるまでに数年を要する場合もある。一般的には、 β 細胞集団の大部分が糖尿病の発症時に破壊されると考えられているが、近年の幾つかの研究によれば、診断時に相当なインシュリン分泌能力が残存している可能性も示唆されている (Steele, et al, 2004, Insulin secretion in type 1 diabetes, Diabetes 53:426-433)。更に、長い前臨床期間中、ランゲルハンス島は免疫による攻撃を受けており、臨界的な量の β 細胞が失われてインシュリンの要求が高まった場合に、初めて高血糖を発症するものと考えられている。

40

【0 0 0 4】

T 1 D が自然経過を辿って進行すると、最終的にはインシュリン分泌能力を完全に消失してしまい、外来のインシュリンに頼らないと生存できなくなる。しかしながら、糖尿病患者が有する β 細胞集団 (BCM) を正確に決定することはこれまで不可能であったため、自然経過に関する判断も、その後の介入が本経過に対して及ぼす効果に関する判断も、間接証拠に基づいて行なわれてきた。同様に、2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes : T 2 D) の患者についても、膵臓のインシュリン産生能力に数々の異常が生じることが報告されて

50

きた (Bernard-Kargar, et al, 2001, Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions, Diabetes 50 Suppl 1 :530-35) が、この型の疾患についても、インシュリン分泌における機能上の欠陥と解剖学的な欠陥とを弁別可能な B C M の測定手段は存在しない。

【0005】

T 1 D を処置するために、免疫治療、幹細胞治療、島移植など、様々な実験的処置が開発されてきた。T 2 D に対する処置は、本疾患の根底にある作用機序についての知識が不足しているため、経験に頼るところが大きかった。糖尿病の様々な相を通じて β 細胞集団がどのように変化するか の知識が得られれば、研究者が新たな治療法を開発する上で、何れの型の糖尿病についても重要な情報になるものと思われる。

10

【0006】

膵臓内分泌部の疾患を撮像する技術の進展は、数々の研究により報告されてきた。Clark 等は、フッ素-18 4-フルオロベンジルトロザミコール (fluorine-18 4-fluorobenzyltrozamicol : F B T) を用いて膵臓本体を撮像できることを実証した (Clark, et al, 2003, Neurofunctional imaging of the pancreas utilizing the cholinergic PET radioligand [(18)F]4-fluorobenzyltrozamicol, Eur J Nucl Med Mol Imaging)。F B T は、膵臓を神経支配するニューロンのシナプス前小胞に存在する特異的神経受容体である、小胞アセチルコリントランスポートに結合する放射性リガンドである。同様に、膵腺房細胞により発現される重炭酸及び／又は有機アニオントランスポートを利用して、[11C] 酢酸塩を用いた膵臓外分泌腺の可視化が行なわれてきた (Shreve, et al, 1997, Imaging of the pancreas and related disease with PET carbon-11-acetate, J Nucl Med 38:1305-1310、及び、Seltzer, et al, 2004, Radiation dose estimates in humans for (11)C-acetate whole-body PET, J Nucl Med 45: 1233-1236)。Markmann 等の近年の報告によれば、屍体の島を移植することにより、移植から 14 ヶ月後に島周囲の細胞集団の脂肪沈着が誘発されることが、化学シフト勾配-エコー磁気共鳴映像法 (magnetic resonance imaging : M R I) による可視化によって示された (Markmann, et al, 2003, Magnetic resonance-defined periportal steatosis following intraportal islet transplantation: a functional footprint of islet graft survival? Diabetes 52:1591-1594)。本アプローチに伴い考えられる課題は、島の同種移植の拒絶後に島周囲の脂肪症が（少なくとも数日間）持続する可能性がある点と、本方法は島を原位置で撮像するには適さないという点である。

20

30

【0007】

β 細胞及び T 1 D に関連する病理を撮像するための、他の従来を試みとしては、the studies by Moore 等による研究が挙げられる (Moore, et al, 2001, Noninvasive in vivo measurement of beta-cell mass in mouse model of diabetes, Diabetes 50:2231-2236、Moore, et al, 2004, Tracking the recruitment of diabetogenic CD8+ T-cells to the pancreas in real time, Diabetes 53:1459-1466、及び、Moore, et al, 2002, MRI of insulinitis in autoimmune diabetes, Magn Reson Med 47:751-758)。放射性同位体キレート剤で修飾した β 細胞特異的な抗 I C 2 m A b を用いることにより、健常なげっ歯類及び糖尿病のげっ歯類の膵臓を生体外で撮像した。放射免疫シンチグラフィーにより、健常なげっ歯類と糖尿病のげっ歯類との間には、m A b の膵臓取り込みに大きな違いがあることを示した (Moore, et al, 2001, Noninvasive in vivo measurement of beta-cell mass in mouse model of diabetes, Diabetes 50:2231-2236) が、本方法が生体内撮像に適しているかどうかは不明である。ましてや、抗ガングリオシド m A b を用いた放射免疫シンチグラフィーは期待できない (Ladriere, et al, 2001, Pancreatic fate of a (125)I-labelled mouse monoclonal antibody directed against pancreatic B-cell surface ganglioside(s) in control and diabetic rats, Cell Biochem Funct 19:107-115)。

40

【0008】

他の実験として、健常なラットとストレプトゾトシン注入したラットとの間で、膵臓による 6-デオキシ-6-[125I] ヨード-D-グルコース取り込みの比較も行なわれ

50

た。島及び腺房組織による放射性リガンド取り込みには違いがあり、 β 細胞欠失膵臓では取り込みが減少することが示されたものの、放射性リガンドの結合の特異性が広く、肝臓による取り込みが高いことから、本アプローチの臨床的な有用性は不明である (Malaisse, et al, 2001, Pancreatic uptake of [2-(14)C] alloxan, IntJ Mol Med 7:311-315)。トレーサーである [2-(14)C] アロキサンの膵臓による取り込みを、健常なげっ歯類及びストレプトゾトシンで処置したげっ歯類について調べる研究も行なわれた。健常な膵臓では、糖尿病の膵臓に対して、放射性トレーサーが優先的に取り込まれることが実証された。しかしながら、アロキサンはそれ自体が糖尿病誘発剤としてよく知られているため、このアプローチの臨床的な有用性も明らかにはなっていない (Malaisse, et al, 2001, Pancreatic uptake of [2-(14)C]alloxan, Int J Mol Med 7:311-315)。ジチゾン及びスルホニル尿素受容体リガンド [例えば、3H-グリベンクラミド等] も造影剤として検討されてきたが、取り込み組織分布が広範であり、その実現可能性を否定する結果が得られている (Garnuszek, et al, 2000, Identification of transplanted pancreatic islet cells by radioactive dithizone-[131I]-histamine conjugate. Preliminary report, Nucl Med Rev Cent East Eur 3:61-63. Ladriere, et al, 2000, Uptake of tritiated glibenclamide by endocrine and exocrine pancreas, Endocrine 13:133-136, and Sweet, et al, 2004, Systematic screening of potential beta-cell imaging agents, Biochem Biophys Res Commun 314:976-983)。

【0009】

実験的膵島炎による磁気共鳴映像法の使用も検討されている。Moore等は (C L I O - T A T ペプチド又はM H C 四量体ペプチド複合体を介した) 超常磁性粒子標識T細胞を用いて、 β 細胞破壊の進展時における浸潤性T細胞の存在を明確に示すことに成功した (Moore, et al, 2004, Tracking the recruitment of diabetogenic CD8+ T-cells to the pancreas in real time, Diabetes 53:1459-1466、及びMoore, et al, 2002, MRI of insulinitis in autoimmune diabetes, Magn Reson Med 47:751-758)。また、磁気共鳴映像法を用いて、膵島炎による島周囲の血管漏洩を超常磁性ナノビーズにより可視化した報告もある (Denis, et al, 2004, Imaging inflammation of the pancreatic islets in type 1 diabetes, Proc Natl Acad Sci USA 101 : 12634-12639)。

【0010】

膵臓内分泌部の β 細胞とニューロンとは、発生学上の起源が異なるにもかかわらず、共通の遺伝子産物を多数発現しており、機能的にも多くの類似点がある。過去の研究によれば、この機能的な類似の根底にある生理化学的な基礎が、タンパク質及び核酸の双方のレベルにおいて示されている (Atouf, et al, 1997, Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer, J Biol Chem 272:1929-1934、Bernal-Mizrachi, et al, 2003, Gene expression profiling in islet biology and diabetes research, Diabetes Metab Res Rev 19:32-42、及び、Scharfmann, et al, 1996, Differentiation and growth of pancreatic beta cells, Diabetes Metab 22:223-228)。本発明者等は、遺伝子発現マッピング研究により、こうした共通の遺伝子産物の1つであるVMA T 2 (小胞モノアミントランスポーター2型: vesicular monoamine transporter type 2) に着目するに至った。VMA T 2は β 細胞により発現されるが、膵臓外分泌腺や他の種々の腹部器官には存在しない (Maffei, et al, 2004, Identification of tissue-restricted transcripts in human islets, Endocrinology 145:4513-4521)。VMA T 2の特異的リガンドであるジヒドロテトラベンアジン (dihydro tetrabenazine: DTBZ) は、中枢神経系障害の陽電子放出断層撮影 (PET) 用として、既に臨床的に使用されている (Vander Borgh, et al, 1995, In vivo imaging of the brain vesicular monoamine transporter, JNucl Med 36:2252-2260)。本発明者等は、精製したヒトの島及び精製した膵臓外分泌腺組織から調製された総膜画分 (total membrane fraction) に対する [3H] DTBZの結合を研究したところ、[3H] DTBZが島の膜には特異的に結合するが、膵臓外分泌腺由来の膜には特異的に結合しないこと

を見出した。更に、免疫組織化学によって、抗VMA T 2とインシュリン免疫反応性が、ともに島β細胞に局在していることを示した(Weihe, et al, 2000, Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters, Faseb J 14:2435-2449、Weihe, et al, 1994, Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat, J Mol Neurosci 5:149-164、Anlauf, et al, 2003, Expression of the two isoforms of the vesicular monoamine transporter (VMAT1 and VMAT2) in the endocrine pancreas and pancreatic endocrine tumors, J Histochem Cytochem 51:1027-1040、及び、Mei, et al, 2002, Early, selective and marked loss of sympathetic nerves from the islets of BioBreeder diabetic rats, Diabetes 51:2997-3002)。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

以上の背景から、β細胞集団(BCM)を非侵略的に決定するための新たな方法であって、例えば糖尿病の治療、島の再生及び移植のための定量的な終点の提供に使用可能な方法を探し出す必要がある。本発明者等は本出願において、β細胞におけるVMA T 2発現を[11C]DTBZ及びPETを用いて定量化することにより、こうした非侵襲的なBCMの測定法が提供されることを報告する。より具体的に、本発明者等は、[11C]DTBZを用いれば膵臓内分泌部を生体内で撮像できること、及び、この放射性リガンドを用いたPET撮像によって、自然発症の糖尿病又はストレプトゾトシン(STZ)により誘発された糖尿病のラットから、正常血糖のラットを識別することに成功したことを報告する。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、陽電子放出断層撮影(positron emission tomography: PET)を用いて、膵臓内分泌部のβ細胞集団を容易に且つ非侵略的に可視化し、定量的に測定することができるという知見、また、この方法が、糖尿病等のβ細胞関連障害の新たな実験的治療、並びに監視及び管理の支えとなるという知見に基づくものである。重要なのは、この方法が、新生糖尿病のおそれがある人の診断検査を可能とする点である。

【0013】

30

即ち、一態様によれば、本発明は、対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定する方法であって：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型(vesicular monoamine transporter type 2: VMA T 2)一特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；及び、前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、前記VMA T 2一特異的放射性リガンドは[11C]ジヒドロテトラベンアジン([11C]DTBZ)である。本発明の別の実施形態によれば、前記コンピュータ化画像は陽電子放出断層撮影(PET)を用いて得られる。本発明の方法は、任意の哺乳類を対象とするβ細胞集団の決定に使用できるが、前記対象はヒトであることが好ましい。

40

【0014】

また、本発明は、対象における代謝障害又は神経内分泌障害を診断する方法であって：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型(VMA T 2)一特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記β細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少又はβ細胞集団の増加を、代謝障害又は神経内分泌障害の存在と関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、前記放射性リガンドは[11C]DTBZであり、前記コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。本発明の別の実施形態によれば、前記代謝障害は

50

β細胞関連障害であり、例としては、必ずしもこれに制限されるものではないが、インスリノーマや他の神経内分泌腫瘍が挙げられる。別の実施形態によれば、前記β細胞関連障害は糖尿病である。本発明の特定の実施形態によれば、前記代謝障害は1型糖尿病である。別の実施形態によれば、前記代謝障害は2型糖尿病である。更なる実施形態によれば、前記代謝障害は前臨床1型糖尿病である。

【0015】

更に本発明は、糖尿病を発症するおそれのある対象の予後を評価する方法であって、周期的な工程として：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMA T 2）－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記周期的に決定されるβ細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少を、前糖尿病状態から糖尿病状態への進行と関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、前記放射性リガンドは[11C]DTBZであり、前記コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。本発明の別の実施形態によれば、前記対象は1型又は2型糖尿病を発症するおそれのある対象である。

10

【0016】

また、本発明は、代謝又は障害の治療の効率を決定する方法であって、周期的な工程として：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMA T 2）－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記周期的に決定されるβ細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、β細胞集団が前記基準測定値に概ね一致していることを、前記代謝障害の治療に成功していることの指標とする工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、前記放射性リガンドは[11C]DTBZであり、前記コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。本発明の更なる実施形態によれば、前記代謝障害は膵臓β細胞関連障害である。特定の実施形態によれば、前記β細胞障害はインスリノーマ又は神経内分泌腫瘍である。更に別の実施形態によれば、前記β細胞障害は糖尿病である。更に他の本発明の実施形態によれば、前記β細胞障害は1型糖尿病、2型糖尿病、又は前臨床1型糖尿病である。

20

30

【0017】

また、本発明は、糖尿病の処置又は予防を管理する方法であって、周期的な工程として：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMA T 2）－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記周期的に決定されるβ細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少を、更なる治療の必要性と関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、前記放射性リガンドは[11C]DTBZであり、前記コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。一実施形態によれば、前記糖尿病は2型糖尿病である。好ましい実施形態によれば、前記糖尿病は1型糖尿病である。

40

【0018】

また、本発明は、対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するために使用されるキットであって、有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMA T 2）－特異的放射性リガンドと、医薬的に許容し得る担体と、任意によりPETスキャナーとを含んでなるキットを提供する。一実施形態によれば、前記放射性リガンドは[11C]DTBZである。本発明の別の実施形態によれば、前記糖尿病は1型糖尿病又は2型糖尿病である。

【0019】

更に、本発明は、対象における神経内分泌障害を診断する方法であって：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMA T 2）－特異的放射性リガンドを前記対象に投

50

与する工程；前記対象の関心領域の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の関心領域におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記β細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少又はβ細胞集団の増加を、神経内分泌障害の存在と関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、前記神経内分泌障害は神経内分泌ガン、例えば前立腺ガンである。

【0020】

また、本発明は、神経内分泌腫瘍を撮像する方法であって：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMA T 2）－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；及び、前記対象の関心領域の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程を含んでなる方法を提供する。一実施形態によれば、前記腫瘍は前立腺腫瘍である。

10

【0021】

本発明のその他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明により明らかになるであろう。但し、詳細な説明及び具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものであるが、例示のためだけに与えられるものであると解すべきである。以下の詳細な説明によれば、本発明の趣旨及び範囲を超えない様々な変更及び修正が、当業者には明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本明細書に記載の通り、本発明者等は、膵臓内分泌部のβ細胞集団を、PETを用いて容易に可視化し、測定するための非侵襲的な方法を見出した。更に、本発明者等はこの方法が、新生糖尿病のおそれがある人の診断検査に使用できるとともに、代謝及び神経内分泌障害の治療にも役立つことを見出した。

20

【0023】

従って本発明は、対象におけるβ細胞集団を決定する方法を提供する。本明細書で使用される「対象」とは哺乳類を指し、その例としては、限定されるものではないが、ウシ、イヌ、マウス、ブタ、ラット、サル、又はヒトが挙げられる。中でも、対象はヒトであることが好ましい。

【0024】

本発明は、対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定する方法であって：有効量のVMA T 2－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；及び、前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、VMA T 2－特異的放射性リガンドは[11C]DTBZである。本発明の別の実施形態によれば、コンピュータ化画像は陽電子放出断層撮影（PET）を用いて得られる。本明細書で使用される「有効量」とは、コンピュータ断層撮影を用いて関心領域の画像を得るのに有効な放射性リガンドの量を指す。画像を得るのに有効な放射性リガンドの量は、各事例に固有の因子に応じて異なる場合がある。こうした因子の例としては、放射性リガンドの種類、対象の種別、対象の体重、及び投与の方法が挙げられる。これらの量は当業者であれば容易に決定することが可能である。

30

40

【0025】

本発明の方法によれば、本明細書に記載された放射性リガンドは、対象となるヒト又は動物に対して、公知の手法により投与することができる。こうした手法としては、限定されるものではないが、非経口投与（例えば、血管内、静脈内、動脈内、又は実質内投与）が挙げられる。好ましい投与方法の一例は、静脈又は動脈注射による非経口投与である。

【0026】

非経口投与の場合には、放射性リガンドを滅菌水溶液と混合してもよい。滅菌水溶液は対象の血液と等張であることが好ましい。このような製剤を調製するには、例えば、生理学的に適合性のある物質（例えば塩化ナトリウム、グリシン等）を含有し、生理学的条件

50

に適合するよう緩衝化されたpHを有する水に、固体活性成分を溶解させて水溶液とし、得られた溶液を滅菌とすればよい。本製剤は密閉アンプル又はバイアル等、単位用量又は複数回用量の容器に入れて供することができる。また、本製剤は上述した方法を含む、任意の注射方法で送達することができる。

【0027】

また、本発明の放射性リガンドは、浸透圧ミニポンプやその他の持続放出器具を用いて放出又は送達することも可能である。基本的な浸透圧ミニポンプによる放出速度は、放出オリフィス内に配置された微小多孔質の高速応答ゲルによって調節することができる。浸透圧ミニポンプは、選択された放射性リガンドの制御放出や標的送達に有用である。

【0028】

また、本発明は、対象における代謝障害又は神経内分泌障害を診断する方法であって：有効量のVMAT2-特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記β細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少又はβ細胞集団の増加を、代謝障害又は神経内分泌障害の存在と関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、放射性リガンドは[11C]DTBZであり、前記コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。本発明の更なる実施形態によれば、代謝障害はβ細胞関連障害であり、その例としては、必ずしもこれに制限されるものではないが、インスリノーマや他の神経内分泌ガンが挙げられる。別の実施形態によれば、β細胞関連障害は糖尿病である。本発明の特定の実施形態によれば、代謝障害は1型糖尿病又は2型糖尿病である。別の実施形態によれば、代謝障害は前臨床糖尿病である。

【0029】

本明細書で使用される「代謝障害」という語は、代謝恒常性の欠失を引き起こす体内の任意の問題を指す。「β細胞関連障害」という語は、β細胞の集団又は機能の変化を特徴とする任意の障害又は疾患を指す。例としては、これに制限されるものではないが、糖尿病、前臨床糖尿病、及び、インスリノーマ等の低血糖障害が挙げられる。本明細書で使用される「糖尿病」という語は、高血糖に繋がる任意のグルコース代謝の障害を指し、1型及び2型の両糖尿病が挙げられる。

【0030】

本明細書で使用される「神経内分泌障害」という語は、神経系と細胞ホルモン放出との間の相互作用を伴う、或いはそれに関連する、任意の障害又は疾患を指す。例としてはクローン病及び神経内分泌ガン(neuroendocrine cancers: NEC)が挙げられる。

【0031】

本明細書で使用されるBCMの「基準測定値(baseline measure)」という語は、対象のBCMの定量的な測定値と比較される、BCMの測定値を指す。例として、BCMの基準測定値としては、コントロール対象のBCMを用いることができる。本明細書で使用される「コントロール対象」とは、代謝障害を有していない哺乳類(例えば、これらに制限されるものではないが、ウシ、イヌ、マウス、ブタ、ラット、サル、又はヒト等)を指す。本発明の好ましい実施形態によれば、コントロール対象はヒトである。別の例として、BCMの基準測定値としては、以前に測定された対象のBCMを用いてもよい。

【0032】

また、対象が何らかの疾患や障害の症候を示していない時点で対象を評価することにより、期待又は正常BCMを決定してもよい。或いは、同様の種別、年齢、及び性別の非罹病対象を評価することにより、期待又は正常BCMを決定することもできる。例えば、25歳から40歳までの正常且つ健全な男性少なくとも30人からBCMの測定値を取得し、成人男性の正常BCMを決定すればよい。女性の正常BCMも同様の手順で決定することができる。また、対象を評価することにより、期待又は正常BCMを求めてもよい。

【0033】

本発明を限定するものではないが、定量的な診断評価法の場合、代謝障害の存在を示す典型的な陽性の結果としては、BCMの基準測定値と比較した場合に、対象のBCMが統計的に有意な増加又は減少を示すことが挙げられる。非限定的な例として、コントロール対象に対するBCMの統計的に有意な上昇を、インスリノーマ、又は他の神経内分泌ガン、又は早期2型糖尿病の存在と関連付けることができる。同様に、前記基準測定値に対するBCMの統計的に有意な減少を、糖尿病の存在と関連付けることができる。

【0034】

加えて、本発明は、1型又は2型の糖尿病を発症するおそれのある対象の予後を評価する方法であって、周期的な工程として：有効量のVMAT2－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記周期的に決定されるβ細胞集団を、β細胞集団の基準測定値と比較し、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少を、前臨床糖尿病から糖尿病への進行と関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、前記放射性リガンドは[11C]DTBZであり、前記コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。対象としては、1型糖尿病又は2型糖尿病のおそれのある患者が挙げられる。

10

【0035】

非限定的な例として、本発明の方法を用いて1型又は2型糖尿病のおそれがある対象の予後を監視及び評価するには、対象のBCMを継続的に（例えば毎月1回ずつ6ヶ月間）測定し、測定値を得るたびに以前のBCM測定値（基準測定値）又は同一対象の測定値と比較すればよい。以前の（基準）測定値と比べてBCMの減少が見られた対象は、更に1型又は2型糖尿病を発症するおそれがあると考えられる。

20

【0036】

また、本発明は、代謝障害を処置又は予防するための治療の効率を決定する方法であって、周期的な工程として：有効量のVMAT2－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記周期的に決定されるβ細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、β細胞集団が前記基準測定値に概ね一致することを、前記代謝障害を処置又は予防する治療に成功していることの指標とする工程を含んでなる方法を提供する。

30

【0037】

本明細書で使用される「コントロール対象のBCMに概ね一致する」とは、基準測定値との間に有意な差異が無いことを意味する。例えば、あるBCMとある基準測定値との間に有意な差が無いことが、周知の統計的方法によって決定された場合、そのBCMはコントロール対象のBCMに概ね一致するといえることができる。本発明の一実施形態によれば、放射性リガンドは[11C]DTBZであり、コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。本発明の更なる実施形態によれば、代謝障害は膵臓β細胞関連障害である。特定の実施形態によれば、β細胞障害はインスリノーマ又は他の神経内分泌腫瘍である。更に別の特定の実施形態によれば、β細胞障害は糖尿病である。更に他の本発明の実施形態によれば、β細胞障害は1型糖尿病、2型糖尿病、又は前臨床1型糖尿病である。

40

【0038】

また、本発明は、糖尿病の処置又は予防を管理する方法であって、周期的な工程として：有効量のVMAT2－特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の膵臓の少なくとも一部について、1又は2以上のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記周期的に決定されるβ細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較し、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少を、更なる治療の必要性和関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、放射性リガンドは[11C]DT

50

BZであり、コンピュータ化画像はPETを用いて得られる。一実施形態によれば、糖尿病は2型糖尿病である。別の実施形態によれば、糖尿病は1型糖尿病である。

【0039】

本発明の方法によれば、対象又は患者のBCMの決定は、糖尿病を処置又は予防する治療の開始後であれば、任意のときに行なうことができる。例えば、対象又は患者がまだ糖尿病のための処置を受けている間に、BCMを決定してもよい。

【0040】

対象又は患者のBCMが正常値よりも低い値で留まり続ける場合、医師は、対象又は患者が受ける糖尿病のための処置を継続する旨を選択すればよい。同様に、継続的な評価を通じて、対象又は患者のBCMに目立った上昇がなく、一定値のまま留まり続けてもいない場合、糖尿病のための処置による効果が得られておらず、処置の用量を増量するか、或いは処置を変更すべきであることを示す指標とすればよい。

10

【0041】

一方、継続的な評価を通じて、対象又は患者のBCMが一定値のまま留まり続けるか、或いは上昇して、正常又は基準BCMに近付いている場合、糖尿病のための処置による効果が得られており、処置量を減少させるか、更には処置を停止してもよいことを示す指標とすればよい。

【0042】

対象又は患者の糖尿病が再発したか否かを決定するべく、対象又は患者の受ける糖尿病のための処置の終了後にBCMを評価することも、本発明の範囲内である。即ち、BCMの決定によって、糖尿病の診断を受けた患者の経過観察を行なうのに利便性の高い方法が提供される。更に、対象又は患者における糖尿病の程度を決定するための手段として、並びに、適切な処置又は予防の選択肢を確認するための手段として、対象又は患者のBCMを決定することも、本発明の範囲内である。

20

【0043】

[11C] BTBNZ及びPETを用いてBCMを定量的に決定することができるという知見は、糖尿病を有する患者を特定する手段を提供するとともに、糖尿病状態の診断用試験の形態で商業化できる可能性を示すものである。こうした試験の開発によって、一般的なスクリーニング手法が提供される。こうした手法によって、糖尿病の早期の検出及び診断を支援するとともに、正常値を下回るBCMが検出された患者の経過観察のための方法を提供することができる。同様に、この試験によって、インスリノーマや他の神経内分泌障害等のβ細胞関連障害を有する患者の早期の検出及び診断を支援するとともに、正常値を上回るBCMが検出された患者の経過観察のための方法を提供することができる。

30

【0044】

従って、本発明は更に、対象の膵臓におけるβ細胞集団を決定するために用いられる、或いは対象における糖尿病等の代謝障害又は神経内分泌障害を診断するためのキットであって、有効量のVMAT2-特異的放射性リガンドと、医薬的に許容し得る担体と、任意によりPETスキャナーとを含んでなるキットを提供する。一実施形態によれば、放射性リガンドは[11C] DTBZである。但し、本発明では、VMAT2に特異的に結合する放射性リガンドを任意に利用することができ、DTBZのVMAT2-特異的類似体には限定されない。VMAT2-特異的放射性リガンド及びDTBZ類似体は、当業者に周知の種々の方法により合成することが可能である。

40

【0045】

本発明の一実施形態によれば、前記障害はインスリノーマ、他の神経内分泌ガン、又は糖尿病である。好ましい一実施形態によれば、糖尿病は1型又は2型糖尿病である。

【0046】

VMAT2-特異的放射性リガンドを含有する製剤を、更に医薬的に許容し得る担体に混合することにより、医薬組成物を含有させることも本発明の範囲内である。従って、本発明は更に、VMAT2-特異的放射性リガンドと、医薬的に許容し得る担体とを含んでなる医薬組成物を提供する。医薬的に許容し得る担体とは、組成物の他の成分に適合する

50

とともに、その受容物に対して有害ではないという意味で「許容し得る」ものでなければならない。許容し得る医薬担体の例としては、特に、カルボキシメチルセルロース、結晶性セルロース、グリセリン、アラビアゴム、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、粉末、食塩水、アルギン酸ナトリウム、スクロース、デンプン、タルク、及び、中でも水が挙げられる。医薬組成物の製剤は便宜上、単位用量にて提供することが好ましい。

【0047】

本発明の医薬製剤は、製薬分野で周知の方法により調製することができる。例えば、放射性リガンドを担体又は希釈剤と混合して、懸濁液又は溶液とする。任意により、1又は2以上の副成分（例えば緩衝剤、香味剤、界面活性剤等）を加えてもよい。担体の選択は投与経路によって様々である。この医薬組成物は本発明の放射性リガンドを対象に投与するのに有用である。放射性リガンドは、前記対象の関心領域について1又は2以上の画像を得るのに有効な量で提供すればよい。上述のように、この量は当業者であれば容易に決定することができる。

【0048】

更に、本発明は、対象における神経内分泌障害を診断する方法であって：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMAT2）-特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；前記対象の関心領域の少なくとも一部について、少なくとも1のコンピュータ化画像を取得する工程；前記対象の関心領域におけるβ細胞集団を決定するべく、前記コンピュータ化画像を定量分析する工程；及び、前記β細胞集団をβ細胞集団の基準測定値と比較して、前記基準測定値に対するβ細胞集団の減少又はβ細胞集団の増加を、神経内分泌障害の存在と関連付ける工程を含んでなる方法を提供する。本発明の一実施形態によれば、神経内分泌障害は神経内分泌ガン、例えば前立腺ガンである。

【0049】

また、本発明は、神経内分泌腫瘍を撮像する方法であって：有効量の小胞モノアミントランスポーター2型（VMAT2）-特異的放射性リガンドを前記対象に投与する工程；及び、前記対象の関心領域の少なくとも一部について、少なくとも1のコンピュータ化画像を取得する工程を含んでなる方法を提供する。一実施形態によれば、腫瘍は前立腺腫瘍である。

【0050】

以下の実施例により本発明を説明するが、これらの実施例は本発明の理解のために記載するものであり、添付の特許請求の範囲により規定される本発明の範囲を、如何なる意味でも限定するものと解釈してはならない。

【実施例】

【0051】

実施例1

方法

【0052】

放射性リガンド

[11C]DTBZの前駆体である、立体化学的に分離された（+）-9-O-デスマチル-α-ジヒドロテトラベンアジンは、ABX Advanced Biochemical Compounds (Radeberg, Germany) から入手した。（+）-α-[11C]DTBZは、適切な前駆体を[11C]メチル化し、生成物をHPLCで精製することにより合成した（Jewett, et al, 1997, A simple synthesis of [11C]dihydrotetrabenazine (DTBZ), Nucl Med Biol 24:197-199、及び、Kilbourn, et al, 1995, Binding of alpha-dihydrotetrabenazine to the vesicular monoamine transporter is stereospecific, Eur J Pharmacol 278:249-252）。[11C]-DTBZ調製物における所望の（+）-産物の純度は、98.5から99.9%までの範囲であった。炭素-11標識放射性トレーサーの比活性は、注射の時点で $>2000\text{ mCi} / \mu\text{mol}$ であった。

【0053】

S T Z 誘発性糖尿病

動物実験は何れもコロンビア大学医学部において、動物管理使用委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee: I U C A C) による審査及び承認の下で行なった。何れの実験も I U C A C 承認の手順に沿って実施した。糖尿病の誘発は、250～350 g のルイス (Lewis) ラットに、ストレプトゾトシン (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo) を単回腹腔内注射 (50 mg / k g) することにより行なった。S T Z 処置による効果を高めるため、ラットは注射前に4時間絶食させた。S T Z を0.1 M クエン酸塩緩衝剤 (p H 5.5) に溶解させ、最終的に滅菌濾過することにより、新鮮な S T Z 溶液を調製した。同様の年齢及び体重の対照ラットには、クエン酸塩緩衝剤のみを注射した。

【0054】

10

血中グルコース及び腹腔内グルコース負荷試験測定

ラットの尾の静脈から血液サンプルを採取した。Accu-Check 血中グルコース監視システム (Roche Diagnostics, Somerville, NJ) を用いて、ラットの血中グルコース (B G) レベルを毎日監視した。腹腔内グルコース負荷試験 (intraperitoneal glucose tolerance tests: I P G T T) は、絶食動物を用いて無麻酔下、前述した手法により行なった (Weksler-Zangen, et al, 2001, The newly inbred cohen diabetic rat: a non obese normolipidemic genetic model of diet-induced type 2 diabetes expressing sex differences, Diabetes 50:2521-2529)。基準 B G の測定後、動物に体重 1 k g 当たり 1 g のグルコースを腹腔内注射してから、その5、10、15、30、60、及び120分後に、B G 濃度を再び測定した。B G 値が4回連続して300 mg / d L を上回り、異常な I P G T T 応答を示した場合、その動物は糖尿病であると判断した。正常血糖の対照動物と、上記の基準を満たした糖尿病ラットとを、撮像実験に使用した。一部の実験では、対照ラットを撮像してから S T Z で処置し、糖尿病であると判定してから再度撮像した。

20

【0055】

ラットの膵臓を切断し、4%パラホルムアルデヒド含有 P B S で固定し、パラフィンに包埋した。得られた10 µ m 厚切片を脱パラフィンし、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。また、切片をモルモット (guinea pig) 抗ウシインシュリン抗体又は V M A T 2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) で染色し、標準的な間接免疫組織化学法で展開した。この切片を、写真用デジタルカメラを備えた Leica DME 光学顕微鏡 (Heidelberg, Germany) で観察した。

30

【0056】

P E T スキャン試験プロトコル

4頭の健常な成体ラット及び3頭の糖尿病の成体ラットを対象として、P E T スキャンを実施した。撮像前に、動物にケタミン及びキシラジンを腹腔内注射して麻酔した。全身透過スキャン (放射データの減衰補正に使用する) の取得後、媒体である滅菌食塩水に放射性リガンドを取り、200～300 µ C i の [11C] D T B Z をボーラス注射により、陰茎静脈から投与した。Concorde microPET-R4 (CTI Molecular Imaging, Knoxville, TN, USA) を用い、注射後60分まで動物の P E T スキャンを動的に取得した。本スキャナーの視野は100×80 mm であり、視野中央40 mm の再構成解像度は2.25 mm である。透過スキャンで得られた減衰補正マトリックスを用いて P E T データを処理し、フーリエビニングを用いて画像を再構成した後、二次元フィルター逆投影を行なった。

40

【0057】

データ分析及び解釈

関心領域の分析及び画像再構成は AsiPro (Concorde Microsystems, Knoxville, TN) で行なった。視覚分析は、P E T 解釈の熟練者2人が、冠状断、横断及び矢状断再構成を用いて行なった。スライス厚5 mm の再構成冠状 P E T 画像を用いて、着目する各ソース器官の活性の同定及び測定を行なった。像平面に手動で関心領域 (R O I) を画定し、時間活性曲線の決定に供した。健常ラットの膵臓中の R O I を手描きするために、本発明者等は肝臓及び胃を目印とし、ランゲルハンス島 β 細胞における D T B Z の高アビディティー摂取を用いて決定した。S T Z 誘発性糖尿病ラットの関心領域は、肝臓及び胃を目印とし

50

、S T Z処置前の動物の膵臓において観察されたD T B Zアビディティパターンに基づいて決定した。全視野及びR O Iにおける[11C] D T B Zの活性を算出した。

【0058】

結果及び考察

過去の研究で、D T B ZがV M A T 2を特異的に標的化することが示されている (Scherman, D. 1986, Dihydratetabenazine binding and monoamine uptake in mouse brain regions, J Neurochem 47:331-339、Scherman, et al, 1980, Effect of drugs on the ATP-induced and pH-gradient-driven monoamine transport by bovine chromaffin granules, Biochem Pharmacol 29:1883-1890、Scherman, et al, 1983, The catecholamine carrier of bovine chromaffin granules. Form of the bound amine, Mol Pharmacol 23:431-436、及び、Scherman, et al, 1983, Characterization of the monoamine carrier of chromaffin granule membrane by binding of [23H]dihydratetabenazine, Proc Natl Acad Sci USA 80:584-588)。インサイチュハイブリダイゼーション、免疫組織化学、及び共焦点顕微鏡法 (Anlauf, et al. , 2003 , Expression of the two isoforms of the vesicular monoamine transporter (VMAT1 and VMAT2) in the endocrine pancreas and pancreatic endocrine tumors, JHistochem Cytochem 51:1027-1040)、並びにその他 (Maffei, et al, 2004, Identification of tissue-restricted transcripts in human islets, Endocrinology 145:4513-4521, and Weihe, et al, 1994, Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat, J Mol Neurosci 5: 149-164)を用いた研究で、V M A T 2免疫反応性がインシュリンと同じ部位に局在化し、或いは他のβ細胞マーカーによって発現されており、抗グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドで染色されたヒトの島細胞には存在しないことが示されている。D T B Zを用いたP E Tスキャンに関連して、V M A T 2の発現は(げっ歯類組織における免疫組織化学により、及び、定量リアルタイムPCRを用いた本発明者等独自の研究により決定されたところでは)C N Sの特定の領域に限定されており、腸管神経系、腸管クロム親和性細胞、副腎髄質のクロム親和性細胞、及び膵臓内分泌部のβ細胞が限局的に染色される (Weihe, et al, 2000, Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters, Faseb J 14:2435-2449)。V M A T 2の神経薬理学及び神経機能解剖が詳細に検討されてきた (Weihe, et al, 2000, Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters, Faseb J 14:2435-2449, and Henry, et al, 1998, The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain, Neurochem Int 32:227246)。

【0059】

ヒトT1Dのモデルとして、S T Z処置ルイス (Lewis) ラットモデルを選択した。S T Zは、げっ歯類において実験的に糖尿病を誘発するのに広く用いられている (Wilson, et al, 1990, Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes, Curr Top Microbiol Immunol 156:27-54)。過去の研究では、S T Zがグルコーストランスポーター2を通じてβ細胞に侵入し、フリーラジカルの形成や酸化窒素の放出等、一連の細胞内変化を誘発することにより、結果としてβ細胞が壊死することが示されている (Szkudelski, T.2001, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, Physiol Res 50:537-546)。S T Z処置の後、これらの実験で用いたルイス (Lewis) ラットは、安定した高血糖状態となった。

【0060】

次に本発明者等は、膵臓内分泌部のβ細胞によって発現されているV M A T 2を、P E Tスキャンに適した放射性リガンドである[11C] D T B Zで標的化した。[11C] D T B Z取り込みを定量測定することにより、本発明者等は膵臓により占有される解剖学的空間内のV M A T 2密度を間接的に算出した。V M A T 2は膵臓内分泌部のβ細胞のみで発現されることから、これによりβ細胞集団の測定値を得た。健常ラットの膵臓のP E T撮像によって、D T B Z取り込みは中心管部の周辺に集中し、膵臓の胃側及び脾臓側領

域の方が、器官頭部と比べて取り込み量が多いことが明らかになった（図2、パネルA、C）。健常ラットの膵臓が示すDTBZアビディティー領域の分布パターンは、過去に報告されたラットの外分泌腺実質内における島の分布と、そのサイズ及び密度が類似していた（Elayat, et al, 1995, An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets, JAnat 186 (Pt 3):629-637、及び、Bertelli, et al, 2001, Association between islets of Langerhans and pancreatic ductal system in adult rat. Where endocrine and exocrine meet together?, Diabetologia 44:575-584）。膵臓DTBZ取り込みは、60分間の撮像期間のうち、注射後1分から約50分までの間、単調増加していた。

【0061】

10

STZ誘発性糖尿病ラット腹部のPET撮像によれば、非糖尿病の対照げっ歯類と比較した場合、膵臓領域におけるDTBZ取り込みのパターン及び密度の両方に差異があることが分かった（図2、パネルB、D）。[11C]DTBZのPETスキャンから再構成された画像の定量分析によれば、STZ処置により糖尿病を誘発した動物の膵臓のVMAT2密度は、処置前のレベルや他の対照動物と比べて低下したものの、完全に消失したわけでは無いことが示された。

【0062】

STZ誘発性糖尿病ラットの膵臓における[11C]DTBZ取り込みの減少は、STZの糖尿病誘発作用、その異常なIPGTT、更には、[11C]DTBZを用いた撮像後のげっ歯類から得られた膵臓切片の分析により得られた微細解剖学的知見にも一致している。STZ誘発性糖尿病ラット由来の膵臓切片の免疫組織化学及びH&E染色によれば、対照げっ歯類由来の切片と比較して、島の面積及び頻度が減少していることが示された（図2、パネルA～D）。抗インシュリン及び抗VMAT2免疫反応性を有する島内の細胞頻度も、STZ誘発性糖尿病ラット由来の膵臓では、対照と比較して減少していた（図2、パネルE～H）。

20

【0063】

実施例2

自然発症糖尿病ラットモデルにおけるβ細胞集団変化の定量分析

方法

【0064】

30

放射性リガンド

[11C]DTBZの前駆体である、立体化学的に分離された(+)-9-O-デスメチル-α-ジヒドロテトラベンジン、ABX Advanced Biochemical Compounds (Radeberg, Germany) から取得した。(+) - α - [11C]DTBZの合成は、適切な前駆体を[11C]メチル化し、生成物をHPLCで精製することにより行なった。[11C]-DTBZ調製物の純度は、所望の(+)-生成物が98.5から99.9%までの範囲であった。注射時における炭素11標識放射性トレーサーの比活性は、>2000mCi/μmolであった。

【0065】

自然発症ラット糖尿病モデル

40

動物実験は何れもコロンビア大学医学部において、動物管理使用委員会（Institutional Animal Care and Use Committee: IUCAC）による審査及び承認の下で行なった。何れの実験もIUCAC承認の手順に沿って実施した。BB-DpラットはマサチューセッツのBiomedical Research Modelsから取得した。BB-Dpラットは、生後50から120日の間で（平均80日）糖尿病を自然発症する（約80%）。

【0066】

血中グルコース及び腹腔内グルコース負荷試験測定

血液サンプルをラットの尾静脈から採取した。Accu-Check血中グルコース監視システム（Roche Diagnostics, Somerville, NJ）を用いて、ラットの血中グルコース（BG）レベルを毎日監視した。腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）は、既述の手順に従い、

50

無麻酔下の動物を絶食させて行なった (Weksler-Zangen, et al, 2001, The newly inbred cohen diabetic rat: a non obese normolipidemic genetic model of diet-induced type 2 diabetes expressing sex differences, Diabetes 50:2521-2529)。基線 BG の測定後、動物に体重 1 kg 当たり 1 g のグルコースを腹腔内注射した。5、10、15、30、60、及び 120 日後に、BG 濃度を再び測定した。BG 値が四回連続して 300 mg/dL を上回り、異常な I P G T T 応答がみられた場合、その動物は糖尿病であると判断した。45 日目、糖尿病の発症前に、基準状態における動物の撮像を行なった。基準スキンの後、異常グルコース負荷試験の明確な徴候が現れるまで、動物を約二週間の間隔で撮像した。

【0067】

10

膵臓組織学

ラット膵臓を切断し、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で固定し、パラフィンに包埋した。得られた 10 μ m 厚切片を脱パラフィンし、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。また、切片をモルモット抗ウシインシュリン抗体又は VMA T 2 (Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo) で染色し、標準的な間接免疫組織化学法で展開した。写真用デジタルカメラを備えた Leica DME 光学顕微鏡 (Heidelberg, Germany) で切片を観察した。

【0068】

PET スキャン試験プロトコル

試験対象に対する PET スキャンは約 50 日目に実施し、その後は約 2 週間おきに、動物が定常的に糖尿病を発症するまで連続して行なった。撮像前にケタミン及びキシラジンを腹腔内注射して動物を麻酔した。全身透過スキャン (放射データの減衰補正に使用する) の取得後、媒体である滅菌食塩水に放射性リガンドを取り、200~300 μ Ci の [11C] DTBZ をボーラス注射により、陰茎静脈から投与した。Concorde microPET-R4 (CTI Molecular Imaging, Knoxville, TN, USA) を用い、注射後 60 分まで動物の PET スキャンを動的に取得した。本スキャナーの視野は 100 $\times$ 80 mm であり、視野中央 40 mm の再構成解像度は 2.25 mm である。透過スキャンで得られた減衰補正マトリックスを用いて PET データを処理し、フーリエリビニングを用いて画像を再構成した後、二次元フィルター逆投影を行なった。

20

【0069】

データ分析及び解釈

30

関心領域の分析及び画像再構成は Asipro (Concorde Microsystems, Knoxville, TN) で行なった。視覚分析は、PET 解釈の熟練者 2 人が、冠状断、横断及び矢状断再構成を用いて行なった。スライス厚 5 mm の再構成冠状 PET 画像を用いて、着目する各ソース器官の活性の同定及び測定を行なった。像平面に手動で関心領域 (ROI) を画定し、時間活性曲線の決定に供した。健常ラットの膵臓中の ROI を手描きするために、本発明者等は肝臓及び胃を目印とし、ランゲルハンス島 β 細胞における DTBZ の高アビディティー摂取を用いて決定した。糖尿病ラットの関心領域は、肝臓及び胃を目印とし、基準状態の動物の膵臓において観察された DTBZ アビディティーパターンに基づいて決定した。ROI における [11C] DTBZ 取り込みの時間対活性曲線を、Asipro ソフトウェアを用いて算出した (図 16~25)。

40

【0070】

結果及び考察

BB-Dp ラットモデルにおける [11C] DTBZ の PET スキャンと、腹腔内グルコース負荷試験による膵臓内分泌部での [11C] DTBZ 取り込みに関する定量データの比較結果から、取り込みの変化と同時に、或いはその後に、通常はグルコース耐性の変化が生じることが明らかになった。10 頭の BB-Dp ラットを用いた一連の試験から、本発明者等は、[11C] DTBZ 取り込みが約 50% 減少すると、グルコース不耐及び高血糖の徴候が現れることを見出した (図 16~25)。

【0071】

実施例 3

50

ヒト対象放射性リガンドにおけるβ細胞集団の変化の決定

【0072】

〔11C〕DTBZの前駆体である、立体化学的に分離された(+)−9−O−デスメチル−α−ジヒドロテトラベンジン、ABX Advanced Biochemical Compounds (Radeberg, Germany) から取得する。(+)−α−〔11C〕DTBZは、適切な前駆体を〔11C〕メチル化し、生成物をHPLCで精製することにより合成する。〔11C〕−DTBZ調製物の純度は、所望の(+)−生成物の純度が98.5から99.9%の範囲である。注射時における炭素11標識放射性トレーサの比活性は $> 2000 \text{ mCi} / \mu\text{mol}$ である。

【0073】

PETスキャン試験プロトコル

全身透過スキャン（放射データの減衰補正に使用する）の取得後、媒体である滅菌食塩水に放射性リガンドを取り、 $200 \sim 300 \mu\text{Ci}$ の〔11C〕DTBZを静脈投与する。注射後120分までの対象のPETスキャンを、GE PETスキャナーを用いて動的に取得する。透過スキャンで得られた減衰補正マトリックスを用いてPETデータを処理し、フーリエリビニングを用いて画像を再構成した後、二次元フィルター逆投影を行なう。

【0074】

データ分析及び解釈

関心領域の分析及び画像再構成はAsiPro (Concorde Microsystems, Knoxville, TN) で行なう。視覚分析は、PET解釈の熟練者2人が、冠状断、横断及び矢状断再構成を用いて行なう。スライス厚5mmの再構成冠状PET画像を用いて、着目する各ソース器官の活性の同定及び測定を行なう。像平面に手で関心領域(ROI)を画定し、時間活性曲線の決定に供する。健常ラットの膵臓中のROIを手描きするために、肝臓及び胃を目印とし、ランゲルハンス島β細胞におけるDTBZの高アビディティー摂取を用いて決定する。

【0075】

上記手順を約28日毎に3ヶ月間に亘って繰り返し、BCMの経時変化を記録した。

【0076】

本明細書に引用した刊行物、参照文献、特許及び特許出願は何れも、その全体が援用によって組み込まれる。その程度は、各々の出願、特許及び特許出願が具体的且つ個別に、その全体が援用によって組み込まれる旨を表示しているのと同様である。

【0077】

明確化及び理解のために、上では本発明をある程度詳しく説明したが、本出願の開示に接した当業者には明らかなように、添付の特許請求の範囲によって定まる本発明の真の範囲を逸脱しない限り、その形式及び詳細に様々な変更を加えることが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】図1は、健常ラット（パネル1A及び1C）及びSTZ誘発性糖尿病ラット（パネル1B及び1D）の腹部の、〔11C〕DTBZを用いて得られたPET画像の冠状面の代表例である。膵臓内分泌部本体を大矢印で示している。また、肝臓左葉（小矢印）及び胃腔（中矢印）も示している。撮像には約 $300 \mu\text{Ci}$ の(+)−α−〔11C〕DTBZを使用した。健常ルイス(Lewis)ラットの撮像後、糖尿病を誘発してから、2度目の撮像を行なった。パネルA及びCに画像を示す動物の血中グルコース濃度は80から120mg/dlの範囲であり、パネルB及びDに画像を示す動物の血中グルコース濃度は300mg/dlを上回っていた。掲載したデータはスキャン期間を合計したイメージである。パネルA及びCに画像を示す動物は撮像6時間前から絶食させたのに対し、パネルB及びDに画像を示す動物の摂食は無制限とした。関心領域（パネル2A～D）内の活性を定量したところ、STZ処置後の〔11C〕DTBZ取り込みには、視野の総活性と比較して減少が見られた（約20～40%）。各視野のグレイスケール密度積分値が、パネ

10

20

30

40

50

ル2 A～Dの左下端に示されている。図中上方は吻側である。

【図2】図2は、撮像後の正常血糖の対照（左側のパネル）及びS T Z誘発性糖尿病（右側のパネル）のルイス（Lewis）ラットの膵臓の免疫組織化学である。対照及びS T Z処置ラット膵臓のパラフィン包埋切片をH & Eで染色し（パネルA～D）、或いは、抗インシュリン抗体（パネルE及びF）又はV M A T 2に対する抗体（パネルG及びH）を用いて免疫組織化学用に処理した。右側のパネルの切片は糖尿病ラットの膵臓本体から取られたものであるが、本ラットにはD T B Z結合の消失が観察された。スライドの間接染色は、西洋ワサビペルオキシダーゼを複合化した抗ヤギ又はモルモット I gを用いて行ない、D A Bで展開した。パネルA及びBは倍率1 0 0 倍の写真であり、他のパネルは何れも倍率4 0 0 倍で撮られた写真である。

10

【図3】図3は、健常ラットにおける初回スキャン（ラセミ D T B Z）の時間活性曲線（time activity curves：T A C）である。

【図4】図4は、Bob 19（健常ルイス（Lewis）ラット）のP E Tスキャンを最初の4分間について合計したフレームである。

【図5】図5は、関心領域（R O I）の画定に使用したBob 19の肝臓及び膵臓の画像である。（A）5 0分におけるフレーム2 6。（B）0～4分及び5 0～5 2分の登録フレーム。

【図6】図6（A）は時間活性曲線であり、（B）はBob 19のR O I画像である。

【図7】図7は、S T Z処置糖尿病Bob 19の（A）T A C及び（B）R O I画像である（全1 9フレームの合計）。

20

【図8】図8はそれぞれ（A）フレーム1 0／1 1及び（B）フレーム1／1 1を用いて画定したBill 17のR O Iである。

【図9】図9は、（A）S T Z前及び（B）S T Z処置後における、Bill 17のT A Cである。

【図10】図10は、S T Z Bill 17のT A Cである。

【図11】図11は、Stu 16のスキャンで得られた異なるフレーム（時間）における、吻側から尾側への移動横断切片上に画定したR O Iである。

【図12】図12は、S T Z処置糖尿病Stu 16のR O Iである。

【図13】図13は、（A）S T Z処置前及び（B）処置後における、Stu 16のT A Cである。

30

【図14】図14は、（A）S T Z処置前及び（B）処置後における、Ted 13のT A Cである。

【図15】図15は、ラセミ D T B Zで撮像したS T Z処置ラットのR O I及びT A Cである。

【図16】図16は、（A）試験開始時及び（B）～（C）試験終了時における、B BラットAの膵臓である。

【図17】図17は、2 0 0 5年4月4日に連続撮像された、自然発症糖尿病B BラットAのR O I及びT A Cである。

【図18】図18は、2 0 0 5年4月1 1日に連続撮像された、B BラットAのR O Iである。

40

【図19】図19は、2 0 0 5年5月5日におけるB BラットAのT A Cである。

【図20】図20は、2 0 0 5年5月1 7日におけるB BラットAのT A Cである。

【図21】図21は、2 0 0 5年4月4日におけるB BラットAの（A）標準取り込み対（B）腹腔内グルコース負荷試験（I P G T T）の結果である。

【図22】図22は、2 0 0 5年4月1 1日におけるB BラットAの（A）標準取り込み対（B）I P G T Tの結果である。

【図23】図23は、2 0 0 5年4月2 0日におけるB BラットAの（A）標準取り込み対（B）I P G T Tの結果である。

【図24】図24は、2 0 0 5年5月5日におけるB BラットAの（A）標準取り込み対（B）I P G T Tの結果である。

50

【図 25】 図 25 は、2005 年 5 月 17 日における BB ラット A の (A) 標準取り込み
対 (B) I P G T T の結果である。

【図 1】

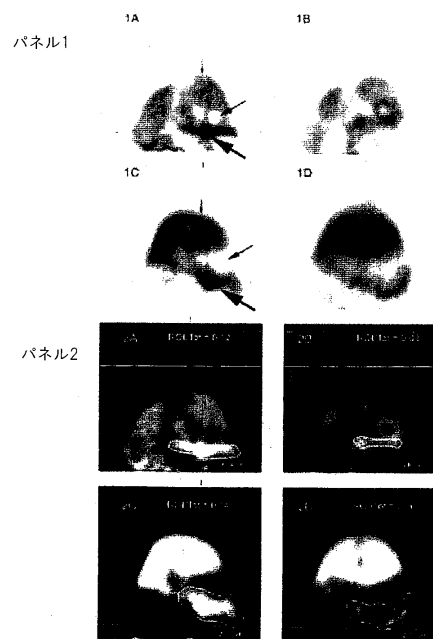


FIG. 1

【図 2】

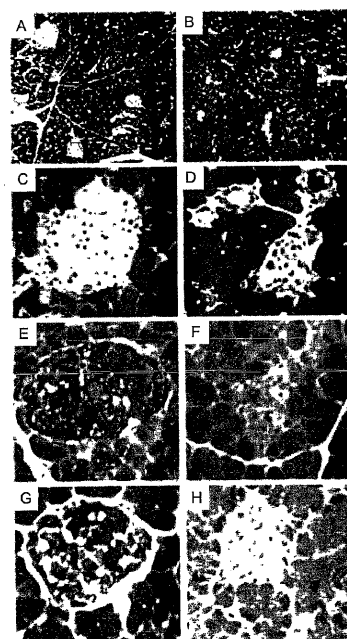


FIG. 2

【図 3】

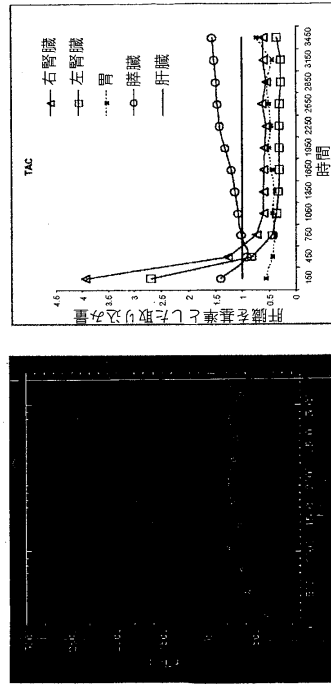


FIG. 3

【図 4】

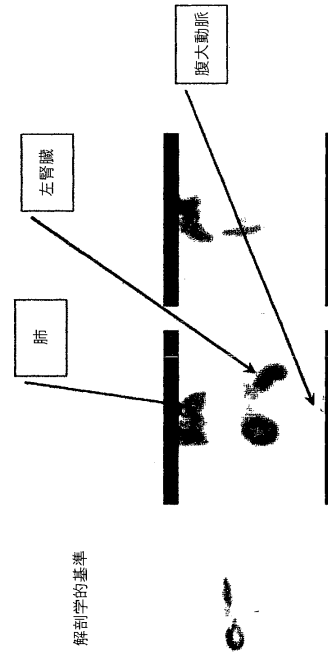


FIG. 4

【図 5】

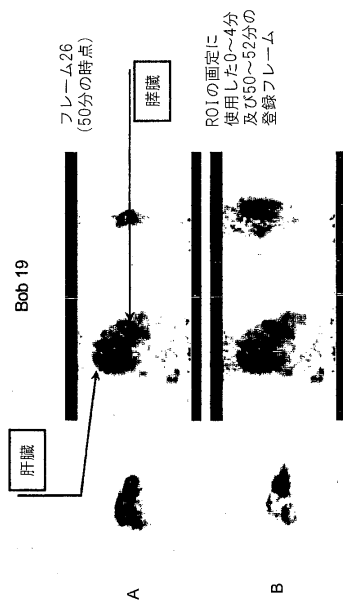


FIG. 5

【図 6】

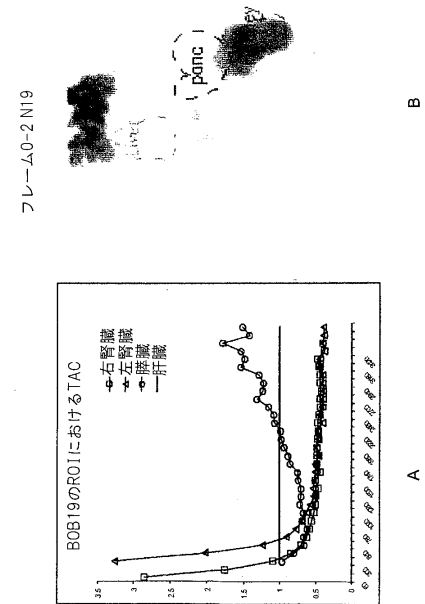
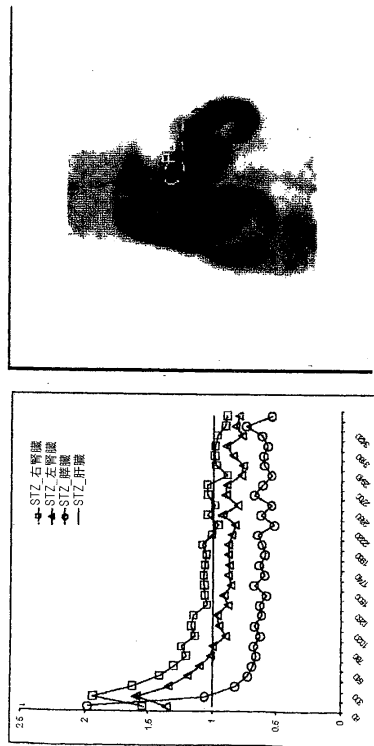


FIG. 6

【図 7】



B

A

FIG. 7

【図 8】

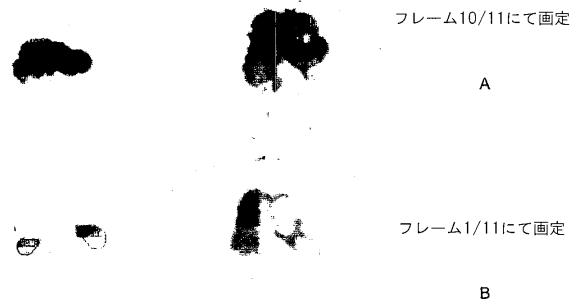
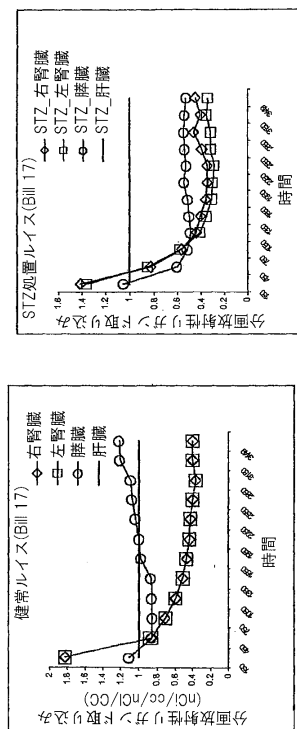


FIG. 8

【図 9】



B

A

FIG. 9

【図 10】

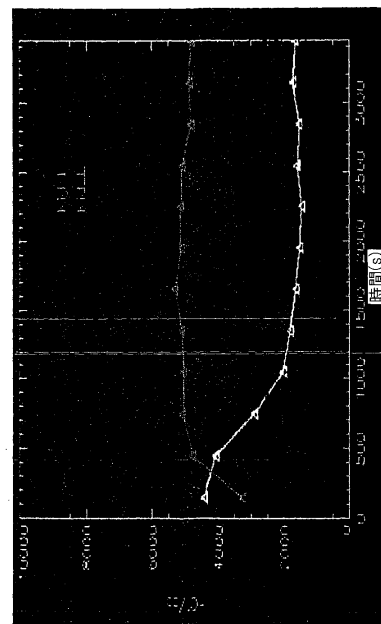
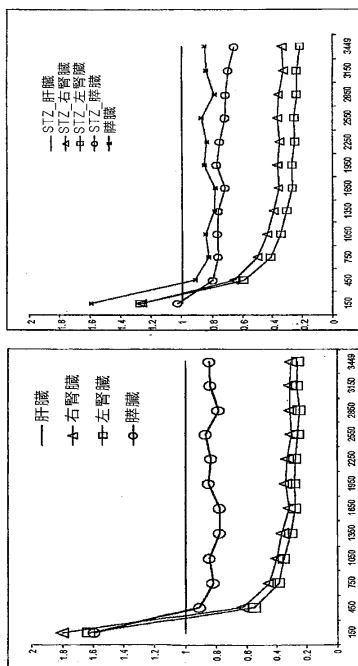


FIG. 10

【図 1 1】



【図 1 3】



B

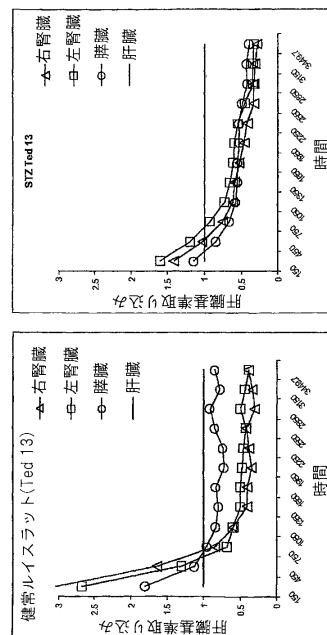
A

FIG. 13

【図 1 2】



【図 1 4】



B

A

FIG. 14

【図 15】

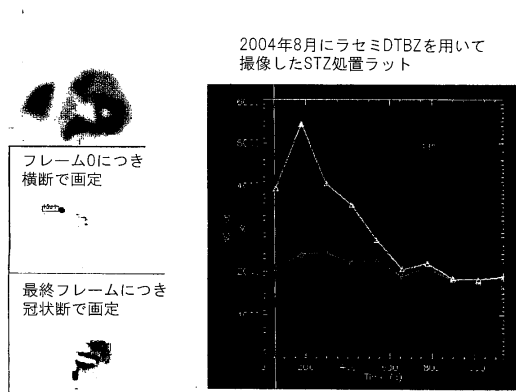


FIG. 15

【図 16】

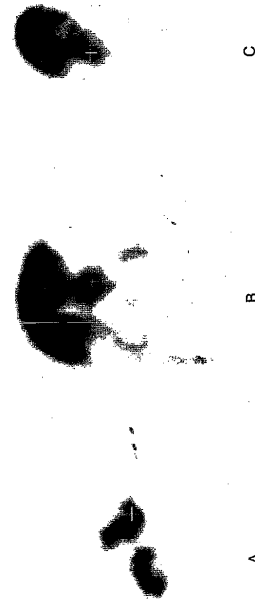


FIG. 16

【図 17】

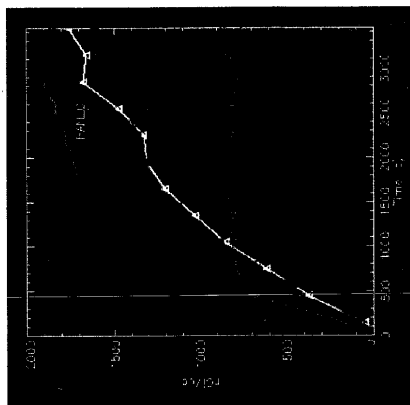


FIG. 17

【図 18】



FIG. 18

【図 19】

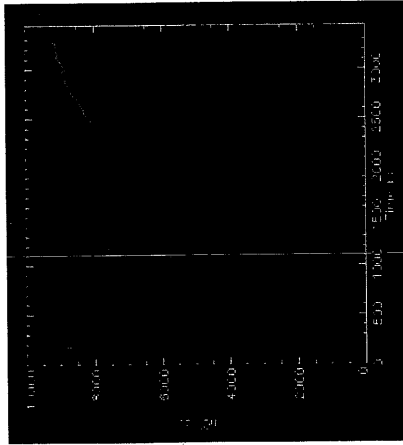


FIG. 19

【図 20】

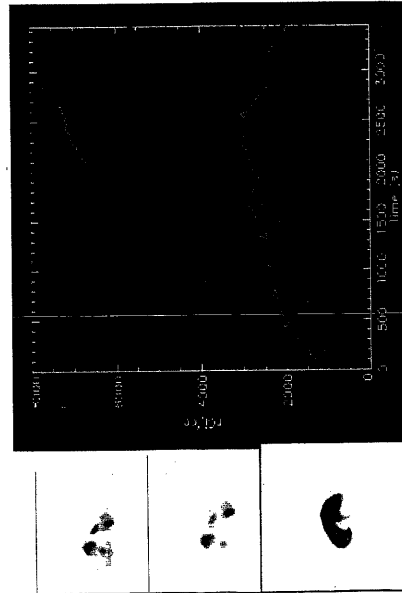
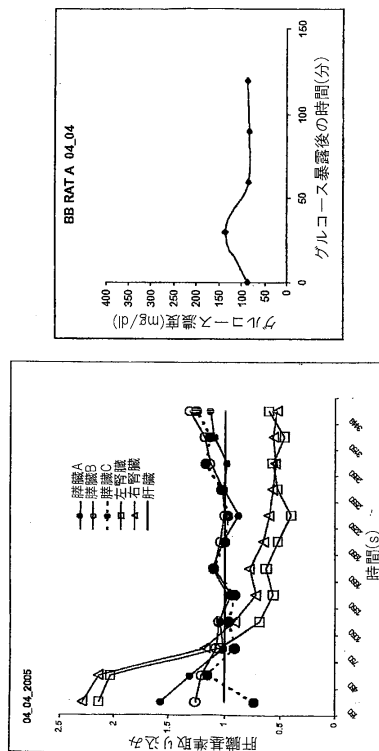


FIG. 20

【図 21】

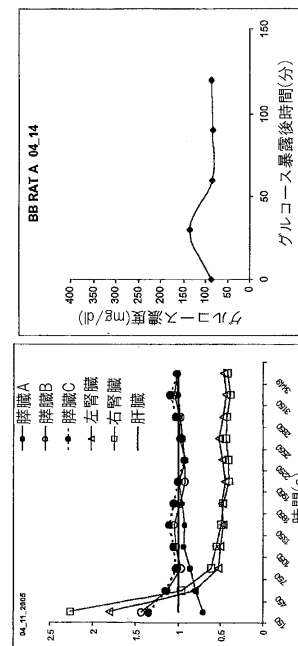


B

A

FIG. 21

【図 22】



B

A

FIG. 22

【図 2 3】

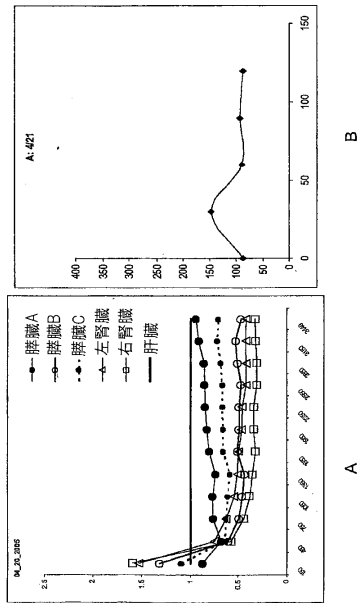


FIG. 23

【図 2 4】

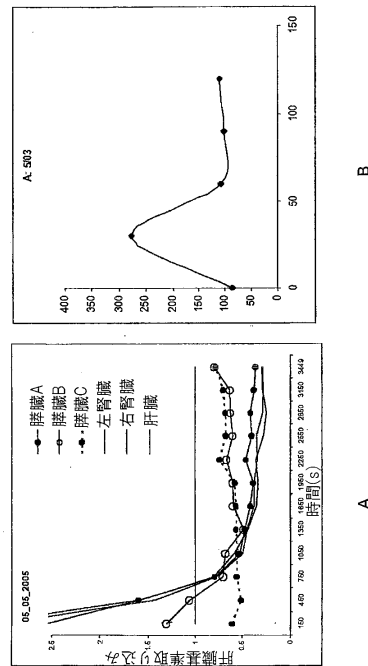


FIG. 24

【図 2 5】

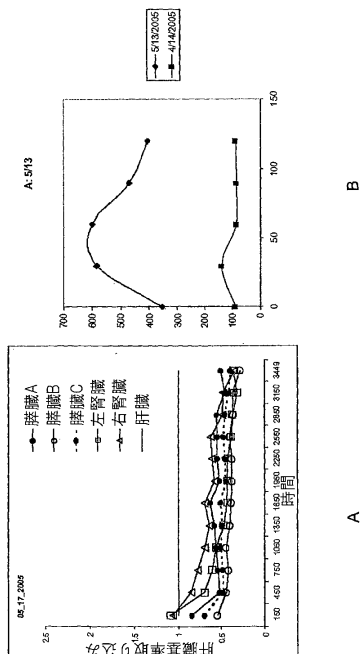


FIG. 25

フロントページの続き

- (74)代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
- (72)発明者 ハリス, ポール
アメリカ合衆国, ニューヨーク 10033, ニューヨーク, カブリニ ブールバード 250,
アパートメント 2エフ
- (72)発明者 マッフェイ, アントネッラ
アメリカ合衆国, ニューヨーク 10033, ニューヨーク, カブリニ ブールバード 250,
アパートメント 2エフ
- (72)発明者 バン ヘールタム, ロナルド
アメリカ合衆国, ニュージャージー 07960, モリスタウン, ウィンザー ウェイ 2

審査官 原田 隆興

- (56)参考文献 MAFFEI, A., et al., Identification of Tissue-Restricted Transcripts in Human Islets, *ENDOCRINOLOGY*, 2004年10月, Vol.145, No.10, p.4513-4521, URL, <http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/145/10/4513>
- KUMAR, A., et al., [11C]DTBZ-PET correlates of levodopa responses in asymmetric Parkinson's disease, *BRAIN [ONLINE]*, 2003年12月, Vol.126, No.12, p.2648-2655, URL, <http://brain.oxfordjournals.org/cgi/reprint/126/12/2648>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 51/00

G01N 33/60

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)