

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語） ^{18}F DiFA による革新的がん診断 PET 低酸素イメージングシステム
（英語）New hypoxia PET imaging with ^{18}F DiFA for innovative therapeutic strategy of cancer.

研究開発実施期間：2015 年 10 月 1 日～2018 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語） 志賀 哲
氏名：（英語） Tohru Shiga

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）北海道大学・大学院医学研究院 内科系部門 放射線科学分野 核医学教室・
准教授
（英語）Department of Nuclear Medicine, Faculty of medicine and Graduate School of Medicine,
Hokkaido University・Associate professor

II 研究開発の概要

【背景と目的】

固形腫瘍内部で形成される低酸素領域は、放射線治療や化学療法に対して抵抗性を示すことが知られている。化学療法においては低酸素誘導因子 HIF-1 を介した治療抵抗性、放射線治療においては酸素効果の低減による治療抵抗性等の機序が解っている。低酸素状態は局所の循環動態や酸素の需要と供給の動的不均衡に強く依存する。針をさして酸素分圧を計測する等の侵襲的な方法では低酸素状態が変化するため、正確に評価できない。生体内で低酸素を正確に評価できる方法は今のところ非侵襲的な画像診断のみとなっている。我々は従来低酸素の検出の為に使用されてきた ^{18}F FMISO PET を用い ^{18}F FMISO 集積は低酸素と関連の深い HIF-1 α 発現と相関し、 ^{18}F FMISO 集積患者においては術前化学療法の効果が低いこと、 ^{18}F FMISO 高集積部位より放射線後の再発が起こること等の低酸素イメージングの有用性につき報告してきた。しかし ^{18}F FMISO は体内動態が遅く投与後 4 時間待たないと撮像できず、投与量（被ばく線量）の低減が難しい事、光学異性体が存在し合成が難しい等の欠点が存在し一般臨床での応用化は困難である事がわかった。

そこで ^{18}F FMISO と同等の低酸素指向性、より速い体内動態、合成のしやすさを持つ低酸素領域を高精度で検出可能な新規低酸素イメージング剤 1-(2,2-dihydroxymethyl -3- ^{18}F -fluoropropyl)-2-

nitroimidazole(以下 ^{18}F DiFA)を開発した。本研究の目的は、腫瘍低酸素イメージング剤としての ^{18}F DiFAの安全性および有用性を検証し、将来的な薬事承認取得に向けた POC 取得を目指す事である。また、同時に ^{18}F DiFAの全自動合成装置の開発を行い、新たな腫瘍診断法の確立および実用化を目指すことである。

【研究成果】

本研究では、(1)早期探索臨床研究、(2)動物実験による POC 取得、(3)臨床研究への薬剤安定供給体制の確立、(4)プロトタイプ自動合成装置の開発を実施した。

(1)早期探索臨床研究

健常者を対象とした First-in-man 臨床試験(8 例)を完遂した。試験薬投与に関連する有害事象は認められなかった。 ^{18}F DiFA 単回静脈 740 MBq 投与群における血中生物学的半減期 平均 6.744 h(4.50~7.88h)であり、 ^{18}F FMISO(8-17 時間)と比較し短かった。尿中排泄率は、1 時間後までの累積尿中排泄率が平均 20.18% (18.50~23.21)、6 時間後までの累積尿中排泄率が 61.26% (50.00~ 67.72)、21 時間後までの累積尿中排泄率が 86.43% (73.19~95.14)であり、迅速な尿排泄を認めた。MIRD 法により成人男での ^{18}F DiFAの内部被曝線量を推定した。 ^{18}F DiFA の被ばく線量は $14.3\mu\text{Sv/MBq}$ で、 ^{18}F FMISO $13\mu\text{Sv/MBq}$ 、FDG $19\mu\text{Sv/MBq}$ と同程度の値であった。また、各臓器各々の内部被ばく線量測定値を算出可能であった。First-in-man 試験では ^{18}F DiFA の安全生、開発コンセプトへの適合を確認できた。

悪性腫瘍患者を対象とした探索的臨床試験では 9 症例で同意をいただき、7 症例にて ^{18}F FMISO、 ^{18}F DiFA の画像比較が可能であった。患者 7 症例に原発巣・転移を含め 22 病変を認めた。視覚的評価では 22 病変の内 ^{18}F FMISO 陽性が 8 病変、 ^{18}F FMISO 弱陽性が 6 病変、 ^{18}F FMISO 陰性病変が 8 病変であった。 ^{18}F FDiFA は陽性 8 病変、弱陽性 6 病変、陰性 8 病変であり、全ての病変で ^{18}F FMISO 所見と一致していた。全ての症例で有害事象の発生はなかった。

(2)前臨床動物実験による Proof of Concept(POC)取得

このテーマでは 3 つのサブテーマに分けて研究をおこなった。すなわち、1) 小動物 PET、ARG、病理との対比による POC 取得、2) ^{18}F DiFA の低酸素腫瘍への集積メカニズムの解明、3) ^{18}F DiFA の脳室内移植腫瘍に対する適用可能性の検討である。

1) 小動物 PET、ARG、病理との対比による POC 取得

①腫瘍内酸素状態の異なる 3 種類の担癌モデル動物 (NCI-H1975, MDA-MB231, FaDu)において ^{18}F DiFA が ^{18}F FMISO と同等の低酸素領域への分布を示すことに加え、 ^{18}F FMISO より早い 時間で良好な腫瘍コントラストが得られることを明らかにした。

②グルタチオン量が減少する治療を模擬したモデル処置として、グルタチオン合成阻害剤である BSO を $500\text{ mg/kg} \times 6$ 回腹腔内投与+20 mM 飲水投与した結果、腫瘍内グルタチオン量が 24%程度まで減少した。この条件において、 ^{18}F FMISO および ^{18}F DiFA の分布をオートラジオグラフィーにて、低酸素領域をグルコース輸送体 GLUT-1 たんぱく質に対する免疫染色にて描出したところ、どちらのプロープにおいても腫瘍内放射能分布と GLUT-1 陽性領域に近い分布を示し、定量した相関係数からも両者の分布の正の相関性が維持されていた。また、10 Gy もしくは 20 Gy の X 線照射を行った際、20 Gy の X 線照射を行った 12 時間後に最もグルタチオン量が減少し、対照群の約 50%程度まで減少した。BSO 実験と同様に、GLUT-1 発現領域との比較を行ったところ、最もグルタチオン量が減少した 20 Gy、

12 時間後においても、 ^{18}F FMISO は低酸素領域と類似した局在を示し、相関性は、X 線照射によって失われる方向ではなく、反対に増加傾向を示した。

2) ^{18}F DiFA の低酸素腫瘍への集積メカニズムの解明

①インビトロ実験では、通常酸素下に比べ、低酸素環境下にて培養した FaDu 細胞において有意に高い ^{18}F DiFA の集積を示した。また、FaDu 移植マウスに ^{18}F DiFA あるいは ^{18}F FMISO を投与し、投与 2 時間後に腫瘍を摘出、ホモジネート化並びに溶媒抽出を行ったのち、細胞高分子画分・低分子画分の放射エネルギーを求めたところ、 ^{18}F DiFA の腫瘍集積量は ^{18}F FMISO と比べて低かったものの、血中クリアランスは向上し、腫瘍血液比は同等以上であった。また、腫瘍内に集積した ^{18}F DiFA の大半は ^{18}F FMISO と同様に低分子画分に存在した。

②in vitro および in vivo において腫瘍内に生成した DiFA-GS の定量解析を LC-MS/MS で行うのに必要となる amino-DiFA-GS の標品の合成に成功した。FaDu 細胞移植ヌードマウスより採取した腫瘍組織凍結切片について精密質量分析を行ったところ、amino-DiFA-GS 標品と同様の同位体パターンを示す化合物が存在することを認めた。またこの化合物について MS/MS 分析を行ったところ、amino-DiFA-GS 標品と同様のフラグメントパターンを示したことから、本化合物は amino-DiFA-GS であることを確認した。さらに、IMS 測定を行ったところ、DiFA は ARG、Pimonidazole（低酸素マーカー）の免疫組織染色陽性領域とは一致しなかったのに対し、amino-DiFA-GS は同様の分布を示すことを認めた。次に腫瘍組織に集積した全放射能に含まれる amino-DiFA-GS の量を Radio-HPLC 法によって定量的に解析した。メタノール溶媒抽出による可溶性分画（低分子結合分画）を radio-HPLC によって詳細に解析したところ、amino-DiFA-GS として 60.3% 存在していることを明らかにした。以上のことから DiFA は腫瘍低酸素量領域において代謝され、主に amino-DiFA-GS として存在することを見出し、DiFA の低酸素イメージング剤としての有効性・妥当性を分子レベルで実証した。

3) ^{18}F DiFA の脳室内移植腫瘍に対する適用可能性の検討

ラット神経膠腫由来細胞 C6 を WKAH ラットの右脳尾状核付近に移植した 18 日目に ^{18}F FMISO、22 日目に ^{18}F DiFA に対する PET 撮像を行った。その結果、両プローブとも高コントラストで脳腫瘍部を描出でき、特に ^{18}F DiFA では ^{18}F FMISO よりも早期に腫瘍/正常組織比の高い像が得られることが明らかとなった。また C6 脳室内移植腫瘍モデルの例数を増やし、中 1 日空けて、 ^{18}F DiFA、 ^{18}F FMISO の順で、プローブ投与 1 および 2 時間後に PET イメージングを行ったところ、 ^{18}F FMISO では 2 時間後まで腫瘍内集積量が増加するのに対し、 ^{18}F DiFA では 1 時間後にはすでに SUVmax 値が最大に達していた。さらに、移植腫瘍の反対側正常脳組織に対する各プローブの SUVmax 値の比を算出したところ、1 時間後から ^{18}F DiFA の腫瘍コントラストは ^{18}F FMISO に比べて高く、2 時間後には ^{18}F FMISO の 2 倍以上に達することが明らかとなった。さらにオートラジオグラフィーの結果から、低酸素マーカーである pimonidazole と ^{18}F DiFA が類似した分布を示したことから、脳腫瘍内においても ^{18}F DiFA が低酸素領域に集積していることが示唆された。本研究結果から、親水性を高めた構造を有する ^{18}F DiFA においても、 ^{18}F FMISO と同等以上の高コントラストで脳腫瘍の低酸素領域を描出できることが明らかとなった。

(3) 臨床 POC 取得のための ^{18}F FDiFA 注射液の製造体制確立と安定供給

国際的基準に合致した高品質の ^{18}F DiFA を製造し、安定的に供給することを目的とし、 ^{18}F DiFA 製造に関する規程・手順書の作成・整備を完了した。

製造、品質試験検査、および環境モニタリングに用いる機器が適切に維持・管理されていること、製造環境が適切に維持・管理されていることを確認した。

作成した手順書をもとに ^{18}F DiFA の製造試験を実施した。試験製造を繰り返し、逸脱のない効率的な作業への手順書の改善に努め、設定した品質を保証できる信頼性の高い ^{18}F DiFA 注射液の製造を確認した。健常者を対象とした First-in-man 臨床試験（8 例）、およびがん患者を対象とした探索的臨床試験（7 例）において、基準書・手順書等に従い ^{18}F DiFA 注射液を製造した。出荷前品質検査項目のすべてにおいて合格していることを確認した後、臨床研究に供給（出荷）した。これらにより、設定した品質を保証できる信頼性の高い ^{18}F DiFA 注射液の製造が確認された。

製造した ^{18}F DiFA 注射液の品質を保証するため、手順書に従い自己点検を実施した。また、臨床研究に供給（出荷）された ^{18}F DiFA 注射液の製造に関する記録について、第 3 者機関による外部監査を受けた結果、重大な事項、重要な事項の指摘はなかった。

(4) ^{18}F DiFA を治験薬 GMP に基づいて全自動合成するプロトタイプ全自動合成装置の開発

HPLC を使わず固相抽出法で ^{18}F DiFA を簡便に精製する方法を設定した。この固相抽出精製法を基に ^{18}F DiFA 全自動合成装置の試作機を製造した。この試作機を用いて ^{18}F DiFA を試製造した結果、臨床使用が可能なレベルの高い品質の ^{18}F DiFA を、より短時間で製造できた。そこで、この試作機を北大アイソトープ総合センターに搬入し、Installation Qualification 及び Operational Qualification を実施、試作機が目的の性能を有していることを確認できた。更に、 ^{18}F DiFA を目標製造時間内に目標製造収率を達成できるよう、本装置の制御パラメータを最適化し、定めた製法により適切な品質の ^{18}F DiFA を製造できることを確認した（Process Qualification）。また、 ^{18}F DiFA 全自動合成装置を治験薬 GMP で管理するため、Windows PC 上で動作する製造管理ソフトウェアを作成した。合成装置試作機及び製造管理ソフトウェアが正しく稼働することを検証するため、コンピュータシステムバリデーションを実施した。コンピュータシステムが正しく作動することを確認できたため、 ^{18}F DiFA 注射液の製造バリデーションを実施、 ^{18}F DiFA の製造手順を最終的に確定した。

【研究成果の要約】

この研究において質の高い ^{18}F DiFA 注射液の臨床供給が可能であり、ヒトでの体内動態・被ばく線量の推定が可能であった。また、安全性確認とともに腫瘍内低酸素への早い時間での集積という臨床 POC が検証できた。また前臨床試験においても ^{18}F DiFA と病理組織との比較、集積のメカニズムの解明が行われ、非臨床 POC が検証できた。また、この診断薬の診断薬に必要な治験薬 GMP に基づいて全自動合成する全自動合成装置のプロトタイプ機が完成した。

【この研究の意義】

我々の最終的なビジョンは難治性腫瘍の治療を個別最適化する低酸素イメージング技術によってがんの放射線療法・化学療法を革新し、患者の予後の改善につなげる事である。今回の研究によって、臨床現場からの要望から生まれた新しい低酸素イメージング ^{18}F DiFA の非臨床および臨床的 POC が検証できた。また、治験をするために必要な全自動合成装置のプロトタイプ機も完成する事ができ、治験の為の準備が整い実用化に向けた次のステップにつなげる事ができた。

【Background and purpose】

Hypoxic regions formed inside the solid tumor are known to be resistant to radiation therapy and chemotherapy. In chemotherapy it becomes refractory to treatment via HIF-1. In radiation therapy it becomes refractory to treatment by reducing the oxygen effect. Hypoxia strongly depends on local circulatory dynamics and dynamic imbalance of oxygen demand and supply. The invasive method such as measuring the oxygen partial pressure by pointing the needle changes the hypoxic state. So, invasive methods can not accurately assess hypoxia.

Currently, noninvasive image diagnosis is the only method that can accurately evaluate hypoxia in vivo. We have been conducting various researches using FMISO PET, which has been conventionally used for detection of hypoxia. We have also reported the usefulness of low oxygen imaging. However, FMISO has a disadvantage that its body kinetics are slow, imaging cannot be performed until 4 hours after administration, dosage cannot be reduced, there are optical isomers so that synthesis is difficult. Therefore, application in general clinical practice is difficult.

Therefore, we developed a novel hypoxia imaging agent F-18 FDiFA that can detect the hypoxic region with high accuracy. The objectives of this research are as follows. And verifying the safety and usefulness of F - 18 FDiFA. Nonclinical POC acquisition. Development of fully automatic synthesizer of F - 18 FDiFA.

【Research Results】

In this research, the following four research was conducted. (1) clinical research, (2) acquisition of POC by animal experiments, (3) establishment of a stable drug supply system for clinical research, (4) development of prototype automatic synthesizer

【Summary of Research Results】

The following six results were obtained in this study ; 1) Clinical supply of high quality F - 18 FDiFA was achieved. 2) Pharmacokinetics and exposure dose of F - 18 FDiFA in humans were estimated. 3) The safety of F - 18 FDiFA in humans was confirmed. 4) Clinical POC of accumulation of F - 18 FDiFA at 2 hours after intratumoral hypoxia administration could be verified. 5) Comparison of F - 18 FDiFA accumulation and pathological organization in preclinical studies. We also clarified the mechanism of F - 18 FDiFA accumulation. Therefore, nonclinical POC was verified. 6) A prototype machine for fully automated synthesis equipment which fully synthesizes based on investigational drug GMP was completed.

【Significance of this research】

Our final vision is as follows. To develop hypoxic imaging techniques that individually optimize the treatment of refractory tumors. Thereby innovating radiation therapy and chemotherapy for cancer, leading to improved patient prognosis.

This study validated the nonclinical and clinical POC of the new hypoxia imaging F - 18 FDiFA. In addition, prototype machines of fully automatic synthesizer could be completed. Therefore, we were ready for clinical trial and could lead to the next step toward practical application.