医薬品開発における分子イメージング技術の導入

三好 莊 介

Challenges of Imaging as a Biomarker in Drug Research and Drug

Sosuke Miyoshi

Bioimaging Research Labs., Astellas Pharma Inc.; 21 Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-8585, Japan.

(Received October 31, 2013)

Positron emission computed tomography (PET) imaging is a clinically translatable technology with the potential to accelerate drug research and development. Therapy monitoring by non-invasive PET imaging study allows a straightforward translation from preclinical to clinical research. In fact, PET imaging is making a major contribution to drug development today and will continue to grow in value. We hereby demonstrate that PET imaging capabilities and our experiences focused on oncology and central nervous system (CNS) therapeutic areas in drug research and development. PET with labeled anticancer drug may be an ideal biomarker for identification of treatment-responsive populations. Using non-invasive PET imaging with labeled anticancer drug, we investigated whether uptake of anticancer drug in tumors is associated with the efficacy. Brain concentration of CNS drug could be obtained according to the radioactivity of PET-labeled CNS drug in brain measured by PET. Usually, blood-brain barrier (BBB) penetration in non-human primates is a good indication for human BBB penetration and we have performed brain PET study in conscious rhesus macaques using special PET camera for non-human primate. Recently, we have successfully identified ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG) PET is useful as a tool for the predictive imaging biomarker against CNS drug-induced neuronal degeneration/cell death and available in the clinical trial. Finally, we would like to mention that how imaging biomarkers should be applied to clinical trials including investigational trials beyond preclinical study.

Key words—positron emission tomography (PET); labeled anticancer drug; imaging biomarker

1. はじめに

医薬品の研究から開発における臨床予測性の向上を目指したアプローチとして、より臨床予測性の高い1) 動物モデルの開発や2) 動物評価方法(検出方法)の適用が重要な課題である。前者は実験動物科学の向上、後者はヒトと同様の非侵襲的な個体を評価する方法としてのバイオイメーキング技術の応用が考えられ、これらの融合によるアプローチについて本稿では紹介したい。われわれはバイオイメーキング技術の中でも特に positron emission computed tomography (PET)/computer tomography (CT) に注目して、主にがん領域や中枢領域などを中心にマウス/ラットのげっ歯類からサルを用いた霊長類の前臨床試験でのイメージングバイオマーカーの探索

を展開している。¹⁾すなわち、臨床開発中の薬剤そのものを PET 標識したトレーサーを用いることにより、抗がん剤では *in vivo* 腫瘍微小環境下での腫瘍移行性を評価することが可能となり、中枢薬では血中濃度からは予測が難しい脳内濃度予測が可能となる。これらは前臨床試験のみならず臨床試験までをつなぐイメージングバイオマーカーとしても大いに活用されるところである。さらに、最近、薬剤誘発神経毒性の安全性イメージングバイオマーカーとしての ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET の可能性を見出すことにも成功し、イメージングバイオマーカーを用いた臨床予測性の高い安全性評価法の開発にも取り組んでいる。²⁾

2. マウス肺がん同所移植モデルと PET/CT 画像評価

臨床予測性の高い動物モデルの構築を目的に、マウス皮下移植モデルではなく、ヒト非小細胞肺がんである Calu-6 細胞をヌードマウスの肺末梢部へ移植する同所移植モデルを作製した。³⁾ マウス肺がん

The author declares no conflict of interest.

アステラス製薬株式会社研究本部バイオイメーキング研究所 (〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 21)

e-mail: sousuke.miyoshi@astellas.com

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム S30-204 で発表した内容を中心に記述したものである。

同所移植モデルでは、腫瘍は肺がん患者さんと同様に肺の内部に存在するため、従来の皮下移植モデルで行われるノギスによる腫瘍体積評価は適用できない。そこで、臨床評価方法と同様に、形態画像測定法である CT による腫瘍体積評価や機能画像測定法として腫瘍の増殖活性をモニターする ^{18}F -fluorothymidine (FLT) と呼ばれるトレーサーを用いた PET 試験による腫瘍の評価を実施した。Figure 1 に示すように、CT による評価ではヨード系造影剤のイオパミロンをマウスへ投与し、さらに 3 次元画像処理 (Real INTAGE, CYBERNET SYSTEMS Co., Ltd.) により、緑色に示した腫瘍の周辺部に腫瘍により誘導された血管新生の様子も鮮明に観察することができた。さらに、このマウス肺がん同所移植モデルを用いて、抗がん剤ドセタキセル (タキソテール) の抗腫瘍作用に関する薬効評価を実施したところ、Fig. 2 に示されるように、vehicle 群では腫瘍増殖がみられたことに対して、ドセタキセル投与群では経時的な腫瘍の退縮が観察された。さらに、CT による腫瘍の体積変化よりも FLT-PET 試験による腫瘍の増殖活性に基づく評価の方がより早期に薬効を捉えることができた。FLT-PET 試験の結果は、腫瘍の増殖活性を示す Ki-67 染色による病理評価ともよく一致した。 ^{18}F -FLT は DNA を構成する核酸の 1 つであるチミジンの誘導体であるた

め、細胞分裂が活発な腫瘍では DNA の複製に伴いチミジンの取り込み量が増加する原理より、 ^{18}F -FLT は増殖活性と相関した腫瘍内への集積を示す。また、 ^{18}F -FLT は核酸トランスポーターにより細胞内に取り込まれ、チミジンキナーゼ I によるリン酸化まではチミジンと同様の動向を示すが、DNA 鎖への合成には取り込まれないため、メタボリックトラップ作用により細胞内へ蓄積するユニークなチミジン誘導体でもある。現在、米国では ^{18}F -FLT は investigational new drug (IND) を申請することなく臨床で使用できる PET トレーサーとなり、多くの臨床試験の中で FDG について広くがん治療に対する効果の判定などに利用されている。しかしながら、肺がんの臨床評価方法としては、簡便な CT による画像評価法が標準診断方法として確立されており、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) と呼ばれる抗がん剤の抗腫瘍作用を評価する基準が設けられている。RECIST は、臨床現場でより簡便かつ効率的に評価することを目的として腫瘍の体積評価ではなく腫瘍の長径のみの一次元評価となっている。複数の腫瘍を持つ患者さんでは、それぞれの腫瘍長径の和として数値化される。そこで、CT によるマウス肺がん同所移植モデルの評価に関しても RECIST に基づいた CT 画像による腫瘍長径のみの一次元評価と三次元 CT 画像

Fig. 1. Micro-CT Imaging of Pulmonary Tumor-induced Neovascularization in Orthotopic Human Xenograft

Fig. 2. Quantitative Evaluation of Anti-cancer Drug Efficacy on Lung Tumor Progression Monitored by FLT-PET and CT

RECIST* version 1.1 outcome measures in clinical (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)

Measurable: Must be accurately measured in at least one dimension (longest diameter in the plane of measurement is to be recorded)....

3D Volume try vs. 1D Diameter

Response rate

- CR (complete response) = disappearance of all target lesions
- PR (partial response) = 30% decrease in the sum of the longest diameter of target lesions
- PD (progressive disease) = 20% increase in the sum of the longest diameter of target lesions
- SD (stable disease) = small changes that do not meet above criteria

Fig. 3. RECIST Criteria in Pre-clinical Study

処理にて腫瘍体積を算出する方法の関係を検討したところ、良好な相関を示すことが判明した (Fig. 3)。

3. 抗がん剤の開発における YM155 と ^{11}C 標識体 YM155 の PET 試験

YM155 はアステラス製薬により創成されたがん細胞に広く発現が認められるサバイピンを標的にした低分子化合物であり、⁴⁾ 国内及び米国にて固形がんあるいはリンパ腫の被験者における第 I 相臨床試験が終了し、^{5,6)} 米国及び EU では第 II 相臨床試験までも終えている。前臨床薬理試験データから、腫瘍中の YM155 存在量が腫瘍に対する効果を規定する因子であることが強く示されていることより、腫瘍中の YM155 存在量を非侵襲的に評価できる優れた方法として YM155 の ^{11}C 標識体 (^{11}C -YM155) を用いた PET 試験の科学的妥当性は高い。さらに、YM155 はマウスやヒトにおいて、ほとんど未変化体のまま排泄される特徴が報告⁷⁾ されているため (特に PET 試験の測定時間内)、 ^{11}C -YM155 PET 試験にて可視化されている放射線は YM155 自体の未変化体を追跡していることになる。一般的に PET 試験の弱点である ^{11}C -YM155 未変化体と ^{11}C -YM155

代謝物の区別がつかないという問題点の議論をする必要がない化合物であると言える。われわれは、Fig. 4 に示すように、YM155 の PET 標識体である ^{11}C -YM155 の合成に成功し、⁸⁾ これを YM155 に感受性を示す腫瘍による担がんマウスへ投与することで、 ^{11}C -YM155 の腫瘍への集積を定量化することができた。一方、YM155 に抵抗性を有する腫瘍における担がんマウスでは、 ^{11}C -YM155 の腫瘍集積は有意に低かったことにより、 ^{11}C -YM155 を用いた PET 試験は薬効予測イメージングバイオマーカーとしての可能性が示唆された。さらに、 ^{11}C -YM155 を健常カニクイザルへ投与し、PET 試験による薬物の全身組織分布を評価したところ、肝臓、腎臓と膀胱を除いたすべての正常組織において ^{11}C -YM155 はほとんど集積しないことが明らかとなった。これは、肝臓がん、腎臓がんと膀胱がん以外の肺がん、悪性リンパ種、乳がん、メラノーマなどは ^{11}C -YM155 の正常組織への移行性が低いことから腫瘍集積との高いコントラストが期待できるため、臨床 PET 試験が有効である可能性が考えられる。興味深いことに、第 I 相臨床試験の結果より YM155 の

Fig. 4. Whole Body PET Imaging of ^{11}C -YM155 in Preclinical Study

1. Radioactive Drug Research Committee (RDRC);

- No IND, the study aim is Biodistribution only (cancer patients), IIT
- Small scale N=30 or less, this is NOT FIM study. Form FDA 2915 [Dosimetry]

2. eIND; Microdosing study

- eIND will be approved within 60 days, the study aim is Biodistribution only (cancer patients). FIM study as a pre Phase 1. [Dosimetry], [Extended single-dose toxicity study]

3. IND; [^{11}C , ^{18}F]drug-PET for prediction of the drug treatment response.

- IND cross-reference and investigational drug will be needed.
- [^{11}C , ^{18}F]-PET study will be combined with drug chemotherapy. [IND], [Investigational drug], [Safety monitoring]

Fig. 5. PET Imaging Research Preclinical to Clinical

認容性は腎臓が悲鳴をあげる用量にて規定されていることとサルの ^{11}C -YM155 による PET 試験が示す腎臓への高い薬剤集積の結果はよく一致している。これらの ^{11}C -YM155 による前臨床 PET 試験の結果を基に、探索臨床 PET 研究や臨床 PET 試験への応用を検討する場合、Fig. 5 にまとめられた3つ方法が考えられる。Radioactive Drug Research Committee (RDRC) は、U.S. Food and Drug Administration (FDA) により認可を受けた施設の RDRC の承認により医師主導の下に実施される臨床 PET 研究であるため、IND は不要である。しかしながら、PET トレーサー量としてのマイクロドーズ投与においても、その薬理活性を示さないことをこれまでのヒトへの投与実績から証明する必要があるため、本試験が FIM であってはならない。また、放射性薬物としての PET 標識体を投与するので、内部被ばく線量の情報も必要であり、試験目的は全身分布試験に限定され、試験規模も 30 人以内と制限がある。FDA から eIND の取得による臨床 PET 試験については、通常 eIND は FDA へ申請後 60 日以内に承認され、試験目的は全身分布試験に限定されるが、前臨床の拡張型単回毒性試験を実施することで、第 I 相臨床試験の前に FIM 試験として実施することが可能である。開発化合物が第 I 相臨床試験以降の段階にあれば、既に FDA より取得している IND を PET 試験用に cross-reference することも可能と思われる。

^{11}C -YM155 の臨床 PET 研究実施の意義については、以下のようにまとめられる。

抗がん薬は副作用を伴うものであるため、患者さ

んの立場からはその薬が本当に自分のがんにとって有効かどうかの判定は重要となる。薬剤の作用機序にかかわらず、がんに対して有効性を示すためには、抗がん剤が当該病巣部位に一定量以上到達することは必須であり、それを事前に確認できる診断法と組み合わせられた治療は理想的なものであることは言うまでもない。さらに、がん患者さんにとって腫瘍発見から有効な治療の開始までの時間はとても貴重であるため、効かない抗がん剤治療を漫然と受けることによる時間のロスは、奏功する可能性のある他の治療機会を奪うことになり、とても深刻な問題点でもある。本 PET 試験のように、抗がん剤の治療効果の判定を 1 日の PET 試験結果にて予測できる可能性があるのであれば、患者さんの治療機会を奪うことなく迅速に最適な治療法を見出す手法となり、その実施意義は大きいと思われる。抗がん剤に対する感受性予測という観点からは、biopsy (生検) により摘出した腫瘍の病理診断を行う方法がこれまでは一般的であると思われるが、biopsy 検査は、1) 患者に痛みを伴う方法であること、2) 摘出術による感染症リスク、また 3) ヘテロな細胞集団である腫瘍を摘出する精度の問題点や 4) 原発巣等の一部の摘出腫瘍からでは転移巣を含めた摘出部以外の正確な情報を得るには不十分であるといった種々の問題点がある。これに対して、本試験法の PET イメージングは、非侵襲的な測定方法であることに加えて、全身スキャンによる診断方法であることから原発腫瘍のみならずすべての転移腫瘍をも包括した診断が可能である。また、PET イメージングはがんの微小環境を含めた状態での抗がん薬の取り込み量を評価できることに加えて、PET イメージングの特長である定量性の高さ、感度のよさを合わせて考慮すると多くの利点を有する診断方法であると言える。近年、開発される薬剤の多くは分子標的治療薬であり、腫瘍における標的分子の発現量あるいは機能量に依存した薬効を発現するため、その必要性はますます高まりつつある。Figure 6 に代表的な抗がん剤の PET 標識体をまとめた。コンベンショナルな抗がん剤から抗体医薬、そしてチロシンキナーゼの分子標的薬まで幅広い研究が行われていることがわかる。PET 試験による ^{11}C -erlotinib の肺がん患者さんの腫瘍への集積を erlotinib 治療に対する奏効予測マーカーとして目指すものであ

Tyrosine kinase inhibitors[N-¹¹C-methyl]Imatinib (Glivec)[¹¹C]Gefitinib (Iressa)[¹⁸F]Gefitinib (Iressa)[¹⁸F]Dasatinib (Sprycel)[¹⁸F]Sunitinib (Sutent)[¹¹C]Erlotinib (Tarceva)

Preclinical: "Positron Emission Tomography (PET) Imaging with [¹¹C]-Labeled Erlotinib: A Micro-PET Study on Mice with Lung Tumor Xenografts"

Clinical: "[¹¹C] labeled erlotinib as a new radiotracer for identification of patients responding to erlotinib treatment: A preliminary study on lung cancer patients"

Monoclonal antibodies[⁶⁴Cu]DOTA-Cetuximab (Erbix)[⁸⁹Zr]Bevacizumab (Avastin)[⁶⁴Cu]DOTA-Rituximab (Rituxan)[⁸⁹Zr]Trastuzumab (Herceptin)**Others**[¹⁸F]Fluoropacitaxel (Taxol)[¹¹C]Docetaxel (Taxotere)5-[¹⁸F]Fluorouracil (5-FU)[¹⁸F]Fluorocyclophosphamide[¹³N]Cisplatin[¹³N]Gemcitabine (Gemzar)[¹¹C]N-2(dimethylamino)ethylacridine-4-carboxamide

Memon et al., *British Journal of Cancer* **105**, 1850 – 1855 (2011)

Fig. 6. Positron-labeled Anticancer Drugs

る。⁹⁾ Personalized Medicine Coalition (PMC) からの“The case for Personalized Medicine,” 3rd edition¹⁰⁾によれば、数年前までに治療薬と Companion diagnostics (CDx) がセットで添付文書に記載されている薬は抗がん剤以外にも含めてもワルファリンの CYP 検査, EGFR 変異などたった 5-6 個だったと思われるが、現在では抗がんにおける Prospective に薬効と診断がセットになった治療がこれほどまでに増えている現状も参考にすべきであろう。

4. 薬物誘発性の中枢毒性（神経細胞死）としてのイメージングバイオマーカー

薬物投与により誘発される中枢毒性、とりわけ神経細胞死に関連する安全性の予兆マーカーとして、現在までに血液中や尿中からのパラメーターとしてのバイオマーカーは一切存在しない。言い換えれば、病理検査以外に神経細胞死の評価方法はなく、言うまでもなく臨床試験で患者さんから脳組織を得ることはほとんど不可能な検査である。そこで、われわれは中枢毒性が懸念される薬物の臨床開発において、ヒトで神経細胞死をモニタリングできる予兆イメージングバイオマーカーとして FDG-PET 試

験を検討した。MK-801 は選択的な非競合的 NMDA 受容体拮抗薬であり、単回投与で膨大部のような特定部位に神経細胞の空胞変性や壊死を起こすことが知られている。MK-801 によるラット脳への神経毒性作用は用量依存的であり、Fig. 7 の HE 染色病理像より 0.4 mg/kg の皮下投与 4 時間後では膨大部に神経細胞の空胞化は起きるが、24 時間後では回復し神経細胞壊死には至らない。一方、1 mg/kg の高用量の MK-801 投与では 4 時間後に膨大部の神経細胞に空胞化がみられ、さらに 24 時間後では神経細胞壊死まで観察される。われわれは、MK-801 による神経毒性のイメージングバイオマーカーとしての FDG-PET について評価したところ、0.4 mg/kg から 1 mg/kg の MK-801 投与 4 時間後に空胞化変性が惹起される膨大部で、FDG の特異的な集積が起こることを観察した。また、FDG の膨大部への集積は 30 mg/kg のスコポラミン投与により神経細胞の空胞化変性を抑制したときにはみられなかったことより、FDG-PET の集積と HE 染色による病理像としての神経細胞空胞化変異は非常によく一致することも判明した。このように、FDG-PET は回復可能なレベルの神経細胞空胞化の変異を MK-801

Fig. 7. FDG-PET as an Imaging Biomarker to MK-801-induced Neurotoxicity

a) Histopathology in hematoxylin and eosin stain, b) FDG-PET/MRI brain images, c) Quantitative analysis of FDG-PET brain images.

投与後4時間後の時点で検出することが可能であることから、FDG-PETはMK-801による神経細胞壊死に対するイメージングバイオマーカーとしての有用性が考えられる。サルについても同様の試験として、さらに10倍高用量である10 mg/kgのMK-801をサルへ投与した4時間後におけるFDG-PET試験では、脳のすべての部位においてFDGの上昇はみられなかった。MK-801 (10 mg/kg)の投与後4時間、24時間の病理評価の結果より、神経細胞の空胞化変異も壊死もそれぞれ観察されなかったことから、FDG-PET試験の神経毒性のイメージングバイオマーカーとしての妥当性が示唆された。

5. まとめ

本稿では、医薬品開発における分子イメージング技術の導入として、PETやCTに注目したアプローチについて述べてきた。分子イメージングの技術は、臨床評価方法を前臨床の動物実験に適用することによる臨床予測性の向上にむけたバイオマーカーとして期待される。開発薬物のPET標識体によるPET試験は、従来の血中薬物濃度からでは推測することが難しい抗がん剤の腫瘍中薬物濃度や中

枢薬の脳内薬物濃度の測定において、とりわけその貢献が期待される場所である。一方で、分子イメージング技術の課題点としては、高コスト、低スループット、画像解析(読影)など複雑な試験である、前臨床・臨床施設がともに限定される、申請時における必須試験項目ではない、などの問題点も残されている。特に、後期の臨床試験として分子イメージング試験を実施する場合、Multi-center trialsとして、撮像用カメラ等の種々の装置が異なる多施設間における試験プロトコルの統一化など課題も多い。今後更なるAlzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), Osteo-Arthritis Imaging (OAI), Oncology Biomarker Quantification Initiative (OBQI)やThe Health and Environmental Sciences Institute (HESI)などのイメージングコンソーシアムの進展による“Standardization & Harmonization & Quantification”の課題克服が期待される。最後に、分子イメージング技術の新たな応用例の1つとして、イメージングによる個体での薬物作用機序 (Mode of Action) の可視化は、製品のコンセプトや差別化ポイントなどの理解の一助につながるこ

から、市販後製品の魅力度向上への貢献も大いに期待されるところである。

REFERENCES

- 1) Miyoshi S., Mitsuoka K., Nishimura S., Veltkamp S., “Radioisotopes—Applications in Bio-medical Science,” Chap. 5, ed. by Singh N., InTech, Rijeka, 2011.
- 2) Shirakawa T., Mitsuoka K., Kuroda K., Miyoshi S., Shiraki K., Naraoka H., Noda A., Fujiwara A., Fujiwara M., *Toxicol. Sci.*, **133**, 13–21 (2013).
- 3) Fushiki H., Miyoshi S., Noda A., Murakami Y., Sasaki H., Jitsuoka M., Mitsuoka K., Matsunari I., Nishimura S., *Anticancer Res.*, **33**, 4741–4749.
- 4) Nakahara T., Kita A., Yamanaka K., Mori M., Amino N., Takeuchi M., Tominaga F., Hatakeyama S., Kinoyama I., Matsuhisa A., Kudoh M., Sasamata M., *Cancer Res.*, **67**, 8014–8021 (2007).
- 5) Tolcher A. W., Mita A., Lewis L. D., Garrett C. R., Till E., Daud A. I., Patnaik A., Papadopoulos K., Takimoto C., Bartels P., Keating A., Antonia S., *J. Clin. Oncol.*, **26**, 5198–5203 (2008).
- 6) Satoh T., Okamoto I., Miyazaki M., Morinaga R., Tsuya A., Hasegawa Y., Terashima M., Ueda S., Fukuoka M., Ariyoshi Y., Saito T., Masuda N., Watanabe H., Taguchi T., Kaki-hara T., Aoyama Y., Hashimoto Y., Nakagawa K., *Clin. Cancer Res.*, **15**, 3872–3880 (2009).
- 7) Minematsu T., Iwai M., Umehara K., Usui T., Kamimura H., *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 619–628 (2009).
- 8) Murakami Y., Matsuya T., Kita A., Yamana-ka K., Noda A., Mitsuoka K., Nakahara T., Miyoshi S., Nishimura S., *Nucl. Med. Biol.*, **40**, 221–226 (2013).
- 9) Memon A. A., Weber B., Winterdahl M., Jakobsen S., Meldgaard P., Madsen H. H., Keiding S., Nexø E., Sørensen B. S., *Br. J. Cancer*, **105**, 1850–1855 (2011).
- 10) Personalized Medicine Coalition, “The Case for Personalized Medicine,” 3rd ed., PMC, Washington DC, 2011.