

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21291

研究課題名(和文)還元型ドデカボレート有機分子化反応を利用した新規BNCT用ホウ素薬剤の開発

研究課題名(英文)Development of novel boron-pharmaceuticals for BNCT using reduced dodecaborate

研究代表者

服部 能英(Hattori, Yoshihide)

大阪府立大学・研究推進機構・講師

研究者番号：50514460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、 $^{10}\text{B}$ 原子と中性子との核反応を利用するホウ素-中性子捕捉療法(BNCT)が、脳腫瘍などに対する有効な治療法として注目を集めている。しかしながら、BNCTに臨床応用されている薬剤は理想的なものではなく、効率的にホウ素を腫瘍細胞に送達することができる新規薬剤の開発が強く望まれている。本研究では、水溶性が高く毒性の低いBNCT用ホウ素薬剤の開発に適したホウ素源の探索を行い、MADBと名付けたホウ素化合物が上記の特性を備えた有望な化合物であることを見出した。さらに、MADBをアミノ酸などの腫瘍細胞選択性の高い有機化合物に結合させ、BNCT用ホウ素薬剤として有望な化合物群の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) for cancer is based on the nuclear reaction of  $^{10}\text{B}$  with thermal/epithermal neutrons to yield high linear energy transfer alpha particles ( $^4\text{He}$ ) and recoiling  $^7\text{Li}$  nuclei in tumor cells. However, only two compounds are used for the BNCT, novel efficient boron-pharmaceuticals are highly demanded. In the course of our developing studies on new boron carrier for BNCT, we investigate the useful boron source for the development of boron-pharmaceuticals for BNCT. As a result, we developed the medium-chain alkyl sulfoniododecaborate (MADB) as ideal boron source for the BNCT agent, because MADB containing compounds showed high cell membrane permeability, low cytotoxicity and high water-solubility, and these compounds could deliver large amount of boron to several kinds of tumor cells.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ホウ素-中性子捕捉療法 ドデカボレート ホウ素薬剤 ドデカボレート含有アミノ酸 ドデカボレート含有ペプチド

1. 研究開始当初の背景

BNCTは、腫瘍細胞に集積した<sup>10</sup>B-ホウ素原子が熱中性子線と核反応を起し、この時に発生する飛程の短いα粒子およびγ線等によって腫瘍細胞のみを破滅に導く細胞選択的ながん治療法である。このためには、腫瘍細胞内だけに30 ppm以上の<sup>10</sup>B-ホウ素原子を選択的に集積させる必要があり、<sup>10</sup>B-ホウ素原子を送達するホウ素薬剤の開発は、BNCTの成否を決める最重要な要素技術となっている(Soloway, A. H., et al., *Chem. Rev.*, 1998)。すなわち、BNCTには、高い腫瘍細胞選択性(T/N比)と高い集積性を併せ持ったホウ素薬剤の開発が不可欠である。現在、BNCTの臨床研究には、ホウ素原子占有率の高いイオン性のメルカプトドデカボレート([B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>-SH]<sup>2-</sup>, BSH、図1)が実用されている。しかし、BSHの腫瘍親和性および腫瘍細胞集積性は低く、BSHに替わるドデカボレート型薬剤の開発が重要な課題となっている。

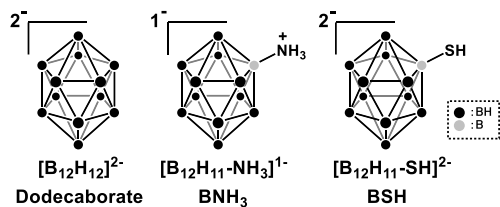


図1 ドデカボレート類

腫瘍選択的なホウ素薬剤開発の有効な手法の一つは、腫瘍親和性分子をホウ酸残基や疎水性カルボラン等のホウ素原子(団)で化学修飾することである。この分子設計コンセプトに基づいて、申請者らも含む多くの研究グループが、これまでに、多くのホウ素化合物を合成・評価してきた(Hattori Y., et al., *Bioorg. Med. Chem.* 2006など)。しかし、毒性や水溶性がボトルネックとなり、BNCTに実用される新規なホウ素薬剤は開発されていない。このため、近年では、ホウ素原子団として、毒性が低く水溶性の高いドデカボレートを腫瘍親和性分子に導入した新規なホウ素薬剤の開発が注目されているが、その反面、無機イオンのドデカボレートを有機分子に導入する素反応は殆ど確立されておらず、未開拓の分野である。

このような背景から申請者らは、ドデカボレートを有機分子に導入するための素反応の開発と、この反応を利用したBNCT用ホウ素薬剤の開発を継続的に行ってきた(Hattori Y., et al., *Appl. Radiat. Isot.*, 2011など)。その中で、腫瘍親和性分子として選択したL-アミノ酸にドデカボレートを導入した化合物の合成と評価を行い、このドデカボレートアミノ酸がBNCT用ホウ素薬剤として非常に有望であることを明らかにしてきた(図2)(Hattori Y., et al., *J. Med. Chem.*, 2012など)。さらに、ホウ素源として用いるドデカ

ボレートについても検討を進め、BSHなどのようなマイナス2価のドデカボレートよりも、電荷が1価還元されマイナス1価のアンモニオドデカボレート([B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>-NH<sub>3</sub>]<sup>1-</sup>, BNH<sub>3</sub>)を含む誘導体の方が、細胞核の中に集積することで高い殺細胞効果を示すということを明らかにしてきた(Hattori Y., et al., *Peptide Science.*, 2014)。

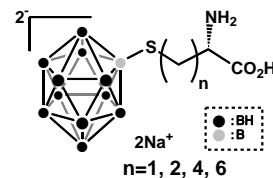


図2 ドデカボレートアミノ酸

このように、BNH<sub>3</sub>のようなマイナス1価に還元された還元型ドデカボレートはホウ素源として非常に有望な化合物であり、これを含む腫瘍指向性分子を合成法の確立とその評価に関する研究は、BNCT用ホウ素薬剤の開発に大きく寄与するものと期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、種々の還元型ドデカボレートを、アミノ酸やペプチドに導入した新規なホウ素薬剤の開発を目的として展開するものであり、還元型ドデカボレートを導入するための素反応とそれを利用した新規ホウ素薬剤の合成および生物活性評価を行う。

3. 研究の方法

本研究では、ホウ素源として利用する還元型ドデカボレートとして、BNH<sub>3</sub>、BSHに種類の異なる2種の官能基を導入したスルフィニウムドデカボレート(DA-BS)、1-トリメチルアンモニオ-12-メルカプトドデカボレート(TN-BSH)をリストアップした(図3)。そしてまず、これらのドデカボレートについて、物性の調査や有機分子に導入するための素反応の開発を検討し、BNCT用ホウ素薬剤のホウ素源として利用しやすい化合物を絞り込んだ。

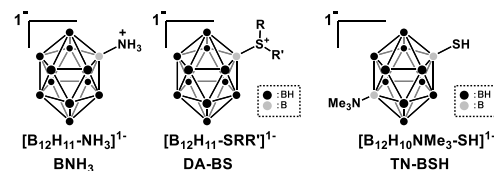


図3 還元型ドデカボレート

次に、絞り込んだドデカボレート誘導体をホウ素源として、腫瘍集積性の高い有機分子(アミノ酸、ペプチド、葉酸、コウジ酸など)へ導入した新規ホウ素化合物の設計・合成を行った。

そして、培養腫瘍細胞を用いた *in vitro* 評価

系を活用して、BNCT 用ホウ素薬剤としての評価を行った。より具体的には、腫瘍細胞としては、グリオーマ、メラノーマ、頭頸部癌細胞を用い、細胞毒性、細胞内集積性、細胞内局在などについて評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) BNCT 用ホウ素薬剤設計に最適な還元型ドデカボレートの絞り込み

##### (1-1) BNH<sub>3</sub>

まず、BNH<sub>3</sub>、DA-BS、TN-BSH のそれぞれについて、それら自体の物性と有機分子に導入するための有機分子化反応について検討を行った。

BNH<sub>3</sub> のアミノ基はドデカボレートの強力な電子吸引性の影響から pKa が 20 と非常に高く、通常のアミノ基とはその反応性が大きく異なる。このため、反応を進めるためには NaOH や NaH などのような強塩基を用いてプロトンを引き抜き、まず [B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub>]<sup>2-</sup> に変換しなければ、殆どの有機反応に利用することができなかった。また、この [B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub>]<sup>2-</sup> はカルボカチオンなどに容易に付加反応を起こすなど、通常のアミノ基では考えられないような副反応を起こすため、非常に制御が難しく、高度に官能基化された薬剤分子に導入することは難しい。さらに、合成した BNH<sub>3</sub> 含有化合物の多くは、予想に反して水溶性が低く、中には全く水に溶けない分子も存在した。このような結果から、BNH<sub>3</sub> は BNCT 用薬剤のホウ素源としては利用しづらい化合物であると判断した。

##### (1-2) TN-BSH

TN-BSH のチオール基の反応は、BSH に類似しており、これまでに我々が開発してきた有機分子化の手法の多くが適用できることが明らかとなった。しかし、TN-BSH は非常に有機溶媒に対する溶解性が低く、アセトニトリル、DMF、DMSO 以外の有機溶媒を利用した有機反応に利用することは非常に困難であった。また、チオール基を足がかりとして有機分子と結合させると、水溶性が非常に低くなり、有機溶媒にも水にも溶けない不溶性の化合物となることが殆どであった。

また、[B<sub>12</sub>H<sub>12</sub>]<sup>2-</sup> から位置選択的に高純度の TN-BSH を合成することも困難であり、その反応収率が低いことから、TN-BSH は BNCT 用薬剤のホウ素源としては利用しづらい化合物であると判断した。

##### (1-3) DA-BS

DA-BS は、これまで我々が開発してきた手法によって、BSH から容易に調製することが可能であった。また、チオール基に種々の鎖長の直鎖アルキル基を導入することで、化合物の自体の疎水性を簡便に調製することが可能である。特に、炭素鎖 8~14 程度の中鎖アルキル鎖を導入した化合物群は、ある程度以上の水溶性も保持しながら、毒性も比較

的低く、BSH には見られなかった高い細胞膜透過性を示すということが明らかとなった。以上のことから、BNCT 用ホウ素薬剤設計において、中鎖アルキル基を導入した DA-BS 類 (中鎖アルキル BSH、以下 MDBA) が、有望なホウ素源であることが明らかとなった。

##### (2) MDBA 含有アミノ酸

一般的に、腫瘍細胞では、自身の異常増殖を補償するために栄養要求性が高まっている。中でも、大型の中性アミノ酸を認識するアミノ酸トランスポーター LAT1 は、腫瘍細胞に特異的に高発現しており、これを標的とした抗がん剤 (JPH203) や BNCT 用薬剤 (L-BPA) が、臨床的にがん治療に利用されている (図 4)。

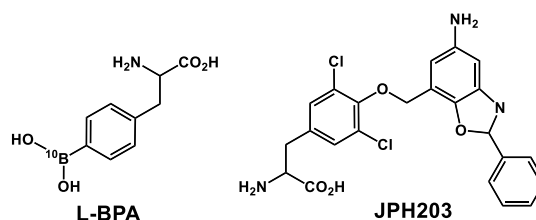


図 4 LAT1 を標的とした薬剤

このような背景から、MDBA をアミノ酸に導入した化合物を合成することができれば、BNCT 用ホウ素薬剤として有望な化合物が開発できるものと期待できる。そこで、本研究では、MDBA をアミノ酸の側鎖に導入した AS-DBA、あるいは C 末端に導入した BADB のような化合物群の設計・合成・評価を行った。

##### (2-1) 側鎖に MDBA を含有するアミノ酸

まず、種々のアルキル鎖長の異なる AS-DBA 類の合成を行った。その合成経路を図 5 に示す。まず、BSH のチオール基を保護した後に、アルキル鎖を導入してから脱保護を行い、MDBA を調製した。そして、MDBA のチオール基に直接 γ-ブロモノルバリンを縮合し目的とする AS-DBA (2a-g) を合成した。

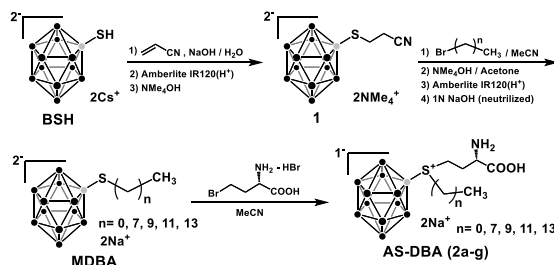


図 5 AS-DBA の合成

AS-DBA 類はいずれも高い水溶性を示し、40g/L 以上の水への溶解度を示した。しかし、アルキル鎖が長くなればなるほど、細胞毒性が高くなる傾向にあり、その多くは BNCT の臨床薬である L-BPA よりも高く、C6 グリオーマ細胞に対する C6 グリオーマ細胞に対する細胞毒性は IC<sub>50</sub> 値で 0.1mM 程度であった

(L-BPA は 10mM 以上)。

しかしながら、C6 グリオーマ細胞への集積量を比較すると、炭素鎖 8 以上の AS-DBA 類は少ない投与量で、高い取り込み量を示した。特に、炭素鎖 12 のアルキル鎖を有する化合物 **2f** は、L-BPA (1.2mM) の 1/12 の暴露濃度 (0.1mM) で、5 倍以上のホウ素原子を腫瘍細胞に送達することが可能であった (図 6)。

以上のような結果から、AS-DBA は BNCT 用ホウ素薬剤として有望な化合物であることが明らかとなった。

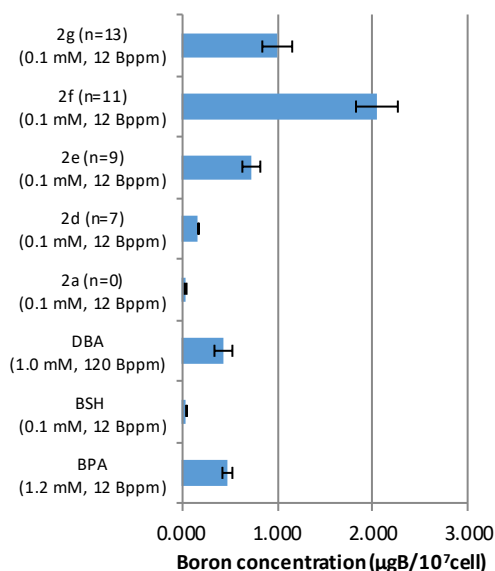


図 6 C6 ラットグリオーマ細胞に対する AS-DBA の腫瘍細胞集積性

(2-2) C 末端に MDBA を含有するアミノ酸

高い腫瘍細胞への選択性を有する L-BPA の C 末端に、AS-DBA 類の結果を基に、炭素鎖 8~12 の MADB を導入した BADB1-3 (**3a-c**) を設計し、その合成を行った。図 7 に示すように、L-BPA のカルボキシル基ヘリンカーとしてアミノプロピルブロミドを導入した化合物 **4** へ MADB を導入し、塩交換を行うことで目的とする BADB1-3 を合成した。

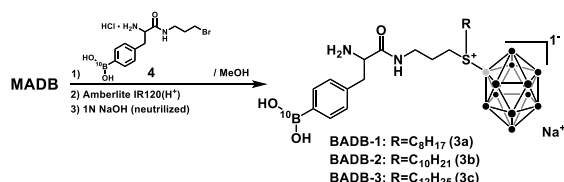


図 7 BADB1-3 の合成

BADB 類は、AS-DBA 類と比較すると、毒性はやや高く、水への溶解度も低い傾向にあった。しかし水溶性については、フルクトースとの錯体を形成することで、20g/L 程度、水に溶解させることが可能であった。この中で、炭素鎖 8 の BADB-1 が最も細胞毒性が低かったため、以後の評価は BADB-1 を利用することとした。

BADB-1 は、AS-DBA 類よりも高い腫瘍細胞

集積性を示し、特に B16 メラノーマ細胞では、AS-DBA-4 の 2 倍位上の量のホウ素原子を腫瘍細胞に送達することが可能であった (図 8)。

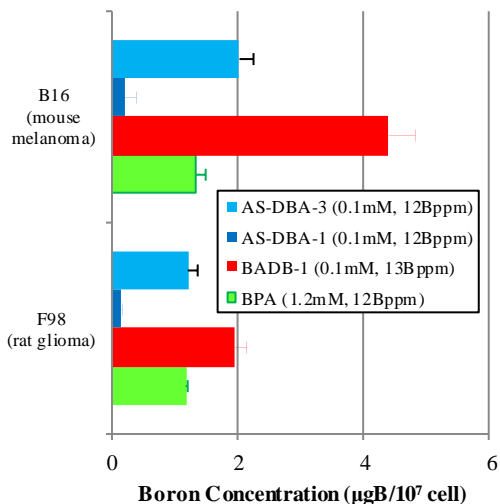


図 8 腫瘍細胞に対する集積性

また、我々が開発したホウ素酸基を特異的に認識する蛍光プローブ (ホウ素センサー) による生細胞中の分布解析の結果、BADB-1 は腫瘍細胞内の核周辺に集積していることが明らかとなった (図 9)。

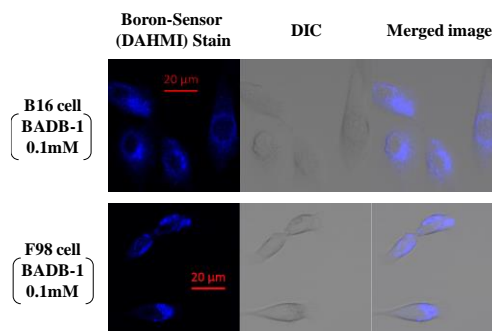


図 9 BADB-1 の生細胞内分布

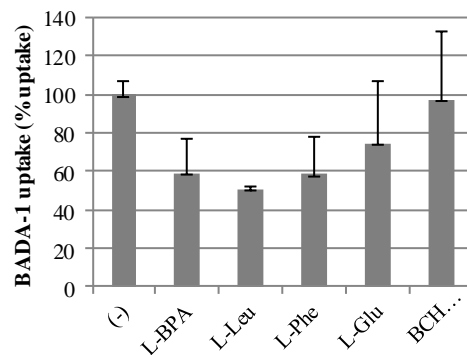


図 10 アミノ酸による BADA-1 の取り込み阻害試験

さらに、LAT-1 の基質となる中性アミノ酸との競合阻害試験を行うと、BADB-1 は、ロイシンなどによって、腫瘍細胞への取り込み

が阻害されることから、LAT-1 によって腫瘍細胞に取り込まれていることが示唆された (図 10)。しかしながら、LAT-1 の阻害剤である BCH を用いた場合には、BADB-1 の取り込みが全く阻害されなかったことから、複数の機構によって BADB-1 が腫瘍細胞内へ取り込まれていることが示唆された。現在、より詳細な BADB-1 の腫瘍細胞集積機構を検討するとともに、BPA 以外の LAT1 の基質を母核とした MADB 含有化合物の設計・合成・評価を進めている。

以上の結果から、BADB-1 は BNCT 用ホウ素薬剤の候補化合物として非常に魅力的な化合物であることが明らかとなった。

### (3) MDBA 含有コウジ酸

麴菌から発見された天然物であるコウジ酸はチロシナーゼ活性を抑制することでメラニンの生成を抑える作用を有し、美白剤などとして利用されている。これまでの我々の研究において、コウジ酸を母核とするホウ素化合物がメラノーマ細胞に対して特異的に集積することが明らかとなっている。

このような背景から、我々は、MDBA を含有するコウジ酸誘導体を合成することができれば、メラノーマ選択的な BNCT 用ホウ素薬剤が合成できるものと期待できると考えた。そこで、AS-DBA などの合成法を応用して、MDBA 含有コウジ酸 (AS-DBK-1~8, 4a-g) の合成を行った (図 11)。

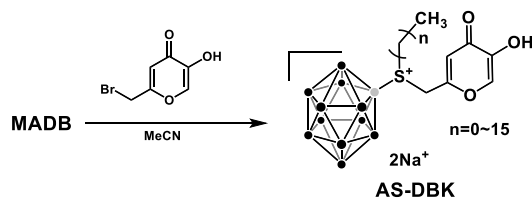


図 11 AS-DBK の合成

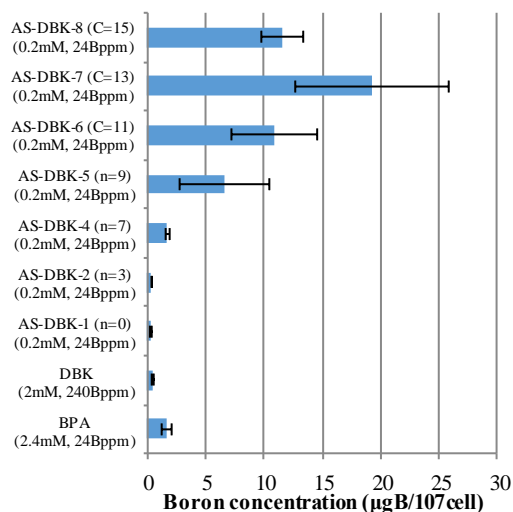


図 12 B16 マウスメラノーマ細胞に対する AS-DBK の集積性

合成した AS-DBK 類の中で、アルキル鎖が

6 以上の化合物は水溶性が非常に高く、20g/L 以上の水への溶解度を示した。しかし、細胞毒性はやや高く、AS-BDA と同様 B16 マウスメラノーマ細胞に対する細胞毒性は IC<sub>50</sub> 値で 0.1mM 程度であった。

次に AS-DBK とアルキル鎖を導入していないドデカボレートコウジ酸 (DBK) および L-BPA の腫瘍細胞集積性の比較を行った (図 12)。AS-BDK の炭素鎖が長くなるにつれ、腫瘍細胞への集積性は高くなる傾向にあった。特に炭素鎖 14 の AS-DBK-7 は、L-BPA の 10 倍以上のホウ素原子をメラノーマ細胞に集積させることができ、非常に有望なメラノーマに対する BNCT 用ホウ素薬剤の候補化合物であることが明らかとなった。

### (4) 総括

以上のように、本研究では BSH のチオール基に中鎖アルキル鎖を導入した MDBA が、BNCT 用ホウ素薬剤のホウ素源として非常に有望な化合物であることを見出した。そして、アミノ酸やコウジ酸などのような腫瘍細胞集積性の高い分子に MDBA を導入した化合物の合成法を確立し、これらが BNCT 用ホウ素薬剤の候補化合物として非常に有望であることを明らかにした。

今後、本研究で合成した新規ホウ素薬剤の候補化合物群の生物学的な評価を進めていくとともに、MDBA をホウ素源とする新規薬剤の設計・合成を進め、BNCT に実用可能な薬剤の開発につなげたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Synthesis and Biological Evaluation of Medium-Chain Alkyl Sulfoniododecaborate Containing *p*-Boronophenylalanine, 服部能英, 石村美紀, 大田洋一郎, 竹中宏誌, 浅野智之, 上原幸樹, 切畑光統, Peptide Science 2017, in press (査読有り)
- ② Development and Elucidation of a Novel Fluorescent Boron-Sensor for the Analysis of Boronic Acid-Containing Compounds, 服部能英, 石村美紀, 大田洋一郎, 竹中宏誌, 浅野智之, 上原幸樹, 切畑光統, Sensors. 2017, Vol. 17, 2036, 2017. (査読有り)  
DOI:10.3390/s17102436
- ③ Development of Reduced Thiododecaborate Containing Amino Acids and Peptides for Boron Neutron Capture Therapy”, 服部能英, 石村美紀, 大田洋一郎, 竹中宏誌, 浅野智之, 上原幸樹, 切畑光統, Peptide Science 2016, pp. 115-116, 2017. (査読有り)
- ④ Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing unnatural amino acid as a boron delivery agent for neutron capture therapy of the F98 rat glioma, 二村元, 川端信司, 服部能英, 田中宏紀, 小野公二, 切畑光統, 他 4 名, Radiation Oncology, Vol. 12,

pp. 26-37, 2017. (査読有り)  
DOI 10.1186/s13014-017-0765-4

- ⑤ Visualization of Boronic Acid Containing Pharmaceuticals in Live Tumor Cells Using a Fluorescent Boronic Acid Sensor, 服部能英, 石村美紀, 大田洋一郎, 竹中宏誌, 切畑光統, ACS Sens. 2016, Vol. 1, pp. 1394-1397, 2016. (査読有り)  
DOI: 10.1021/acssensors.6b00522
- ⑥ Comparison of the pharmacokinetics between L-BPA and L-FBPA using the same administration dose and protocol: a validation study for the theranostic approach using [18F]-L-FBPA positron emission tomography in boron neutron capture therapy, 渡邊翼, 服部能英, 田中宏紀, 小野公二, 切畑光統, 他 4 名, BMC Cancer, Vol. 16, pp. 859- 869, 2016. (査読有り)  
DOI 10.1186/s12885-016-2913-x
- ⑦ Visualization of Boronic Acid Containing Compounds in Live Cell using Fluorescent Boron Sensor, 服部能英, 石村美紀, 大田洋一郎, 竹中宏誌, 切畑光統, Peptide Science 2015, pp. 285-288 (2016). (査読有り)
- ⑧ Detection of Boronic Acid Derivatives in Cells Using Fluorescent Sensor, 服部能英, 石村美紀, 大田洋一郎, 竹中宏誌, 渡邊翼, 田中宏紀, 切畑光統, Organic & Biomolecular Chemistry, Vol. 13, pp. 6927-6930, 2015. (査読有り)  
DOI: 10.1039/c5ob00753d015.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 服部能英, アルキルスルホニオドデカボレート含有アミノ酸のBNCT用ホウ素キャリアーとしての評価, 日本薬学会第 138 年会, 2018年, 石川県立音楽堂
- ② Yoshihide Hattori, Synthesis and Biological Evaluation of Medium-Chain Alkyl Sulfoniododecaborate Containing p-Boronophenylalanine, 第54回日本ペプチド学会, 2017年, 大阪府立大学
- ③ 服部能英, ドデカボレート含有型BPAのホウ素キャリアーとしての評価, 第14回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2017年, 郡山ビューホテルアネックス
- ④ 服部能英, 還元型チオドデカボレート含有アミノ酸の合成とBNCT用ホウ素薬剤としての評価, 日本薬学会第 137 年会, 2017年, 東北大学
- ⑤ Yoshihide Hattori, Development of Reduced Thiododecaborate Containing Amino Acids and Peptides for Boron Neutron Capture Therapy, 第53回日本ペプチド学会, 2016年, 京都テルサ
- ⑥ 服部能英, ドデカボレート含有アミノ酸類のホウ素キャリアーとしての評価, 第13回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2016年, 東京大学
- ⑦ 服部能英, ホウ素-中性子捕捉療法に用い

る次世代型ホウ素薬剤の開発, 第 18 回癌治療増感シンポジウム, 2016 年, 奈良県文化会館

- ⑧ 服部能英, ドデカボレート含有アミノ酸類のホウ素キャリアーとしての評価, 第 12 回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2015 年, 神戸学院大学
- ⑨ 服部能英, がん-ホウ素中性子捕捉療法のためのホウ素薬剤の開発研究, 4th Biomedical Forum, 2015 年, 大阪府立大学

[図書] (計 3 件)

- ① 服部能英, 切畑光統, 「創薬研究におけるホウ素含有アミノ酸およびペプチド」創薬研究におけるホウ素含有アミノ酸およびペプチド, 医療・診断をささえるペプチド科学 —再生医療・DDS・診断への応用—, 第 VI 編第 6 章, シームシー出版刊, 2017 年, pp.265-270
- ② 服部能英, 切畑光統, 「ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) 用 10B-ホウ素化合物の研究開発」, 日本ペプチド学会, Peptide Newsletter 第 106 号, 2017 年, pp. 2-4.
- ③ 服部能英, 「Live cell imaging を指向した蛍光型ホウ素センサーによる L-BPA およびその誘導体の分析」, 日本中性子捕捉療法学会, NCT letter 第 3 号, 2016 年, pp. 23.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ホウ素含有化合物

発明者: 服部能英, 上原幸樹, 切畑光統

権利者: 公立大学法人大阪府立大学、ステラファーマ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2016-148978

出願年月日: 平成 28 年 7 月 28 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部能英 (HATTORI, Yoshihide)

大阪府立大学・研究推進機構・講師

研究者番号: 50514460