

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07624

研究課題名(和文)セラノスティクスとしてのBNCT-診断と治療をふまえたホウ素製剤開発の試み

研究課題名(英文)BNCT as Theranostics, development of boron-containing drugs for diagnostics and therapy

研究代表者

旗野 健太郎 (Hatano, Kentaro)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50228475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：(1)18F-F2製造法の最適化を行い、o-カルボランの標識を試みた。21%の放射化学的収率で標識体が得られた。(2)125I標識DABIを参考とし、モデル反応としてイソチオシアン酸とペプチドの反応を検討した。DABIは対応するアミノベンジル体よりイソチアン酸を合成し、その酸化ヨウ素化によりI-125標識しているため、(1)の方法で標識可能であると考えられる。(3)既報にしたがい18F-FBAMを合成し、これとBSHの反応を検討した。多官能性クロスリンカーを用いてBSHのチオール基と生理活性ペプチドの官能基を架橋することで、ポジロン標識BNCT製剤の開発が可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究よりポジロン標識BNCT製剤のドラッグデザインについていくつかの可能性を指し示すことが出来た。得られた化合物を用い、PETによる生体内動態の最適化を通じ、BNCT製剤の開発を加速することができ、さらにその適用を判断するコンパニオン診断が実現されることが期待される。様々な生理活性ペプチドをBNCT製剤デザインに持ち込むことで、この治療法の適用拡大が期待される。

研究成果の概要(英文)：(1)Production of 18F-F2 was optimized and synthesis of o-carborane using the reagent was examined. 18F-o-Carborane was obtained in 21% radiochemical yield. (2)According to peptide formation using 125I-DABI reaction of peptide and phenyl isothiocyanate was examined as model reaction. As DABI was obtained by oxidative iodination, similar preparation will be possible using 18F-F2 shown above. (3)BSH was successfully labeled with 18F-FBAM which indicates possibility of construction of BNCT-PET reagent using multi functional cross linking reagents.

研究分野：放射性医薬品化学

キーワード：中性子補足療法 BNCT PET 腫瘍選択的ペプチド フッ素-18 放射線治療

## 1. 研究開始当初の背景

がんの診断と治療は車の両輪である。がん細胞という異物の性質を知り、正確に診断し、適切な治療を加えることが望まれる。がん細胞の存在する箇所を見定め、拡がり进行评估するために画像診断は必須であるが、がん細胞の性質にもとづいたポジトロン核医学 (PET) に代表される質的画像診断の重要性も認識されてきている。近年、同一か同等の放射性医薬品を診断核種と治療核種によって標識し同一のメカニズムにもとづいて診断 (diagnosis) と内用療法による治療 (therapy) を行うセラノスティクス (theragnostics) というコンセプトが提唱され注目をあつめている。これは、通常のがん治療に比べて正常細胞への侵襲が小さく、正確な診断に立脚するので予後予測が正確であり、効果の小さい治療を避けることができるなどの成果が期待できる。また、転移がんなど拡がりをもったがんにも適用可能である。いわば evidence based medicine、個別化医療の代表選手といえる。

浸潤がんや多発がんなどの難治性がんや、再発がんなど未だ治療法が確立できていないがんに対して、次世代の放射線治療として期待されているのが中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) である。BNCTの殺細胞効果は放射線によるものであるが、がん選択性はホウ素製剤の取り込みに依存するため、化学療法の側面も持つ。現在、広く行われている *p*-borono phenylalanine (BPA) によるBNCTにおいては、事前にBPAのフッ素-18アナログである <sup>18</sup>F-FBPA によるPETスキャンを行い、治療の適用を判断する。これはBPAと<sup>18</sup>F-FBPAによるセラノスティクスと捉えることができる。これまでBNCTに用いられてきたホウ素製剤はBPAとsodium mercaptododecaborate (BSH) のみであった。今後のBNCTの高度化には新たなホウ素製剤の開発が不可欠であると考えられる。我々はPETなど分子イメージングによる前臨床試験がホウ素製剤開発を加速するものと考えてきたが、本研究ではさらにBNCTをセラノスティクスの実践例ととらえ、分子メカニズムに立脚した診断と治療の実現が可能か検討する。

## 2. 研究の目的

BNCTは①<sup>10</sup>B 標識ホウ素製剤を投与し、②がん細胞に集積させ、③中性子を照射し、④中性子と<sup>10</sup>Bの核反応によって生じるα線と反跳リチウム核によってがん細胞を破壊する、という過程を取る。このため、BNCTはがん細胞選択的重粒子線治療ともいわれる。高いがん細胞選択性を担保するのはホウ素製剤のがん細胞選択的な取込みである。十分な治療効果を達成し、また周辺正常組織への障害を低減する観点から、がん組織1gあたり20-30μg以上の<sup>10</sup>B取り込みと、3~5以上のがん組織対正常組織比が必要とされる。今後のBNCTの高度化には新たなホウ素製剤の開発が不可欠であるが、これまでBNCT製剤の開発には化合物を開発し、担がん動物に投与後中性子照射して有効性、安全性、実用性を検討するというプロセスが取られてきた。これには極めて長い時間と手間がかかり、新規ホウ素製剤の実用化を妨げてきた一因であると考えられた。

研究代表者は平成27~28年度挑戦的萌芽研究「BNCT製剤早期実用化を実現する新規分子イメージング技術」において、新世代BNCT製剤のscaffoldとして期待されるσカルボランを求電子的なフッ素化剤で<sup>18</sup>F標識する技術を開発した。カルボラン類はホウ素9~10個と炭素がカゴ状に結合した物質であるので分子内ホウ素数を増やすのに有利である。またベンゼン環とほぼ同等の大きさを有していることから薬剤デザイン上も有望な部分構造であり、BNCT製剤開発のscaffoldとして期待されている。BNCT製剤の開発にあたっては、分子の構成をがん細胞への特異的な集積をもたらすがん標的部位(アンテナ)とホウ素部位に分けて考えると实际的である。例えばBPAはアミノ酸輸送タンパクLAT1のアンテナととらえられるが、そのホウ素重量は分子量に対し5%程度である。もしアンテナ構造として分子量150,000の抗体を用い、薬剤の特異性がBPAと同程度である場合、BPAと同等のホウ素を細胞内にもたらすためには750個のホウ素を組み込む必要がある。上記のσカルボランは10個のホウ素を持つので、分子量が2000程度のアンテナを修飾するのに適している。これはアミノ酸20残基程度のペプチドに該当する。本研究ではこの規模のペプチドを創薬ターゲットとする。

本研究は上記の研究成果を発展させることで、がん細胞に特異的な生化学過程を描出するPET診断薬と、特異的な分布に基づくBNCT治療薬を同時に開発することを目的とする。BNCTはいわば薬剤の分布そのものが治療の有効性を保証する。本研究では上記の研究成果をふまえて、フッ素-18標識カルボラン類を効率的に生理活性ペプチドに導入する方法を開発し、ホウ素製剤開発のワークフローとして整備する。がん特異的な取り込みが確認された標識ペプチドは診断薬としての有用性が証明されるとともに、BNCT治療薬としての有効性が期待され、セラノスティクスを実現すると考える。

## 3. 研究の方法

(1) フッ素-18標識フッ素ガスの製造法の最適化を行う。2回照射法によるフッ素-18標識フッ素ガス製造には、いくつかのパラメータがあるが、収量、安定性、比放射能の観点から最適のパラメータを見出す。得られたフッ素-18標識フッ素ガスを用い、σ-carboraneの標識を試みる。  
(2) 本研究ではσ-carboraneをscaffoldとして考えてきた。一方、Nestorらはclosododecaborateを母体に、ホウ素製剤開発を推進している。特に、求電子的なヨウ素化反応によりI-125標識した、[(4-isothiocyanatobenzylammonio)undecahydro-closo-dodecaborate(1-)]

(DABI) (Bioconjugate Chem. 2003;14:805-810) は注目される。この方法はイソチオシアン酸がペプチドのアミノ基と反応しチオ尿素構造を形成することにより、生体分子を標識することが可能となる。この反応は温和な条件で進行すると考えられ、非常に有用である。このイソチオシアン酸とモデルペプチドの反応を検討する。

(3) Sodium mercaptododecaborate (BSH) を scaffold としたイメージング剤の開発を目指し、BSH 標識のモデル実験を行う。Knies らの方法 (App. Radiat Isot 2011;69:1226-1230) に従い、N-[6-(4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzylidene)aminoxyhexyl]maleimide ( $^{18}\text{F}$ FBAM) を合成し、BSH との反応を試みる。

#### 4. 研究成果

(1) フッ素-18 標識フッ素ガスの製造法の最適化を行った。安定同位体である酸素-18 を濃縮した酸素ガスにサイクロトロンで加速されたプロトンビームを照射し  $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$  核反応にてフッ素-18 を製造した。酸素-18 濃縮酸素ガスを冷却容器に回収したのち、ターゲット容器にフッ素ガス/アルゴンの混合ガスを導入し、2度目のプロトンビーム照射を行うことで同位体交換を行い、フッ素-18 標識フッ素ガスを製造した。製造の諸条件を最適化した。混合ガスを 0.3~1% に調整したところ、1% で良好な回収率が得られることがわかった。得られたフッ素-18 標識フッ素ガスを用いて  $^{18}\text{F}$ -fluoro-borono-phenylalanine (FBPA) を製造したところ、このフッ素-18 標識フッ素ガスが良好な比放射能を持っていることがわかり、さらなる標識合成を行う見通しが立った。こうして得られたフッ素-18 標識フッ素ガスを用い、*o*-caroborane の標識を試みた。*o*-caroborane ( $\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{12}$ ) をクロロホルムに溶解し、冷却下フッ素-18 標識フッ素ガスと反応させたところ 21% の放射化学的収率でフッ素-18 標識体が得られた。

(2) 本研究では *o*-carborane を scaffold として考えてきた。一方、Nestor らは closododecaborate を母体に、ホウ素薬剤開発を推進している。特に、求電子的なヨウ素化反応により I-125 標識した、[(4-isothiocyanatobenzylammonio)undecahydro-closo-dodecaborate(1-)] (DABI) (Bio-conjugate Chem. 2003;14:805-810) は注目される。この方法はイソチオシアン酸がペプチドのアミノ基と反応しチオ尿素構造を形成することにより、生体分子を標識することが可能となる。この反応は温和な条件で進行すると考えられ、非常に有用である。このイソチオシアン酸とモデルペプチドの反応を検討した。

12 残基のモデルペプチド (ARGIKGIRGFSG) とイソチオシアン酸フェニルのホウ酸緩衝液 (pH9.2) 中の反応を行った。37°C、60 分反応を行ったところ、47% の収率で反応は進行した。ここで一等量のイソチオシアン酸フェニルを追加しさらに 120 分反応したところ、60% の一置換体とともに、18% の二置換体が生成した (図 1)。Rana らによるとイソチオシアン酸によるアミノ基の修飾は、pH7 で行うことで、N 末端アミノ基にのみ反応し、Lys の  $\epsilon$  アミノ基への反応しないよう制御できる (Bioconjugate Chem 1990;1:357-362)。中性条件で反応が制御できる可能性が示唆された。

DABI は、ammoniaundecahydrocloso-dodecaborate(1-) とカルボニル化合物の還元的縮合により得られるアミノベンジル体よりイソチオシアン酸を合成し (Inorg Chem 1999;38:5887-5893)、さらにこれのクロラミン T による酸化的ヨウ素化により I-125 標識している (Bioconjugate Chem. 2003;14:805-810)。したがって、当初計画していたカルボラン類同様 closododecaborate 誘導体も求電子的フッ素化剤であるフッ素-18 標識フッ素ガスによって標識可能 (図 2) と考えられる。

図 1 イソチオシアン酸フェニルによるモデルペプチドの標識

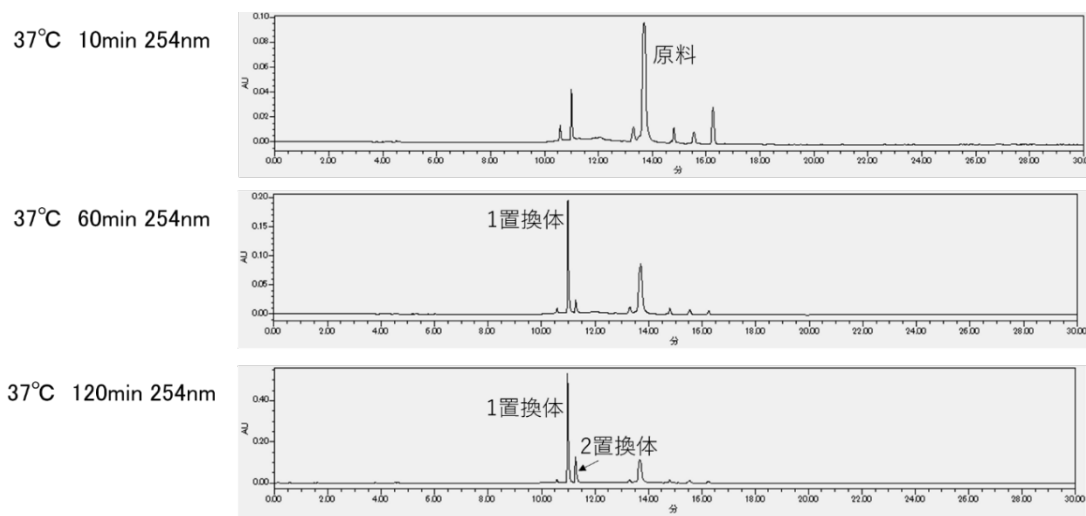
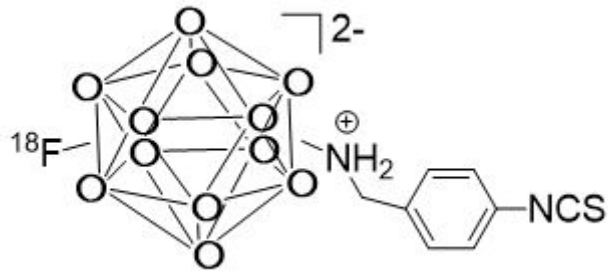


図2  $^{18}\text{F}$ -DABI



(3) Sodium mercaptododecaborate (BSH) を scaffold としたイメージング剤の開発を目指し、BSH 標識のモデル実験を行った。Kniess らの方法(App. Radiat Isot 2011;69:1226-1230)に従い、N-[6-(4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzylidene)aminoxyhexyl]maleimide ( $^{18}\text{F}$ FBAM) を合成した。固相抽出カラムで精製された $^{18}\text{F}$ FBAM に、0.5mL の 1/15mol リン酸緩衝液 (pH7.2) に溶解した 5mg の BSH (Katchem, Prague, Czech Republic) を加え反応させた (図 4 A)。反応混合物を HPLC (column; Capcell pak C18 UG120 S5 4.6mmID X 250mm, eluent; 0.5M IPC-DHAA, 0.1% formic acid :  $\text{CH}_3\text{CN}$  (4:6), flow rate; 1mL/min) にて解析した。室温 $\sim$ 50 $^\circ\text{C}$  では反応の進行はほとんど見られなかったが、60 $^\circ\text{C}$ , 51min で 33% の生成物が確認された。70 $^\circ\text{C}$ , 20min では 78% の生成物が見られたが、 $^{18}\text{F}$ FBAM は残存せず、分解物と見られる高極性副生物が見られた (図 3)。以上、 $^{18}\text{F}$ FBAM によって BSH のチオール基をポジトロン標識することが可能であった。図 4 B に示すような多官能性クロスリンカーを用いて BSH のチオール基、生理活性ペプチドのアミノ基、カルボキシル基、チオール基を架橋することで、ポジトロン標識 BNCT 製剤の開発が可能であると考えられた。

図3 FBAMによるBSHの標識

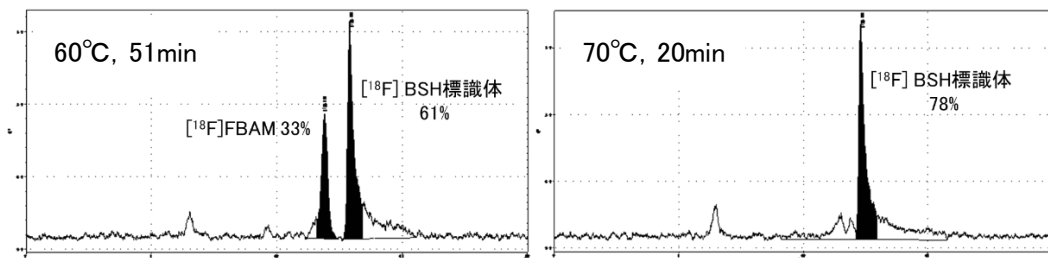
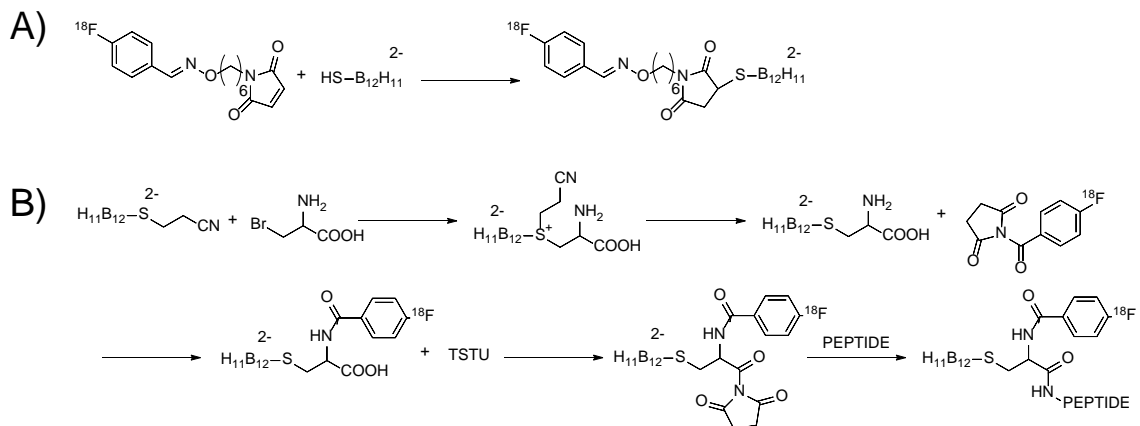


図4 多官能性リンカーによるBNCT/PET製剤の合成



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saptiama Indra, Kaneti Yusuf Valentino, Yuliarto Brian, Kumada Hiroaki, Tsuchiya Kunihiko, Fujita Yoshitaka, Malgras Victor, Fukumitsu Nobuyoshi, Sakae Takeji, Hatano Kentaro, Ariga Katsuhiko, Sugahara Yoshiyuki, Yamauchi Yusuke	4. 巻 25
2. 論文標題 Biomolecule Assisted Synthesis of Hierarchical Multilayered Boehmite and Alumina Nanosheets for Enhanced Molybdenum Adsorption	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 4843 ~ 4855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.201900177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 福光 延吉; 山内悠輔; Saptiama, I; 有賀 克彦; 旗野 健太郎; 熊田 博明; 藤田 善貴; 土谷 邦彦	4. 巻 760
2. 論文標題 メソポーラス加工を応用した新規アルミナ吸着剤の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Isotope News	6. 最初と最後の頁 15-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Masahide, Ishikawa Eiichi, Yamamoto Tetsuya, Hatano Kentaro, Joraku Akira, Iizumi Yuichi, Masuda Yosuke, Nishiyama Hiroyuki, Matsumura Akira	4. 巻 138
2. 論文標題 Potential use of prostate specific membrane antigen (PSMA) for detecting the tumor neovasculature of brain tumors by PET imaging with 89Zr-Df-IAB2M anti-PSMA minibody	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 581 ~ 589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-018-2825-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 旗野健太郎
2. 発表標題 Zr-89 標識PSMA minibody PETによる前立腺がん等のイメージング
3. 学会等名 PETサマーセミナー2019 in 福島（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本核医学技術学会編集委員会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 山代印刷株式会社出版部	5. 総ページ数 386
3. 書名 新核医学技術総論 技術編	

1. 著者名 西弘大、 旗野健太郎、 間賀田泰寛、 渡部浩司、 津國浩之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 公益社団法人日本アイソトープ協会	5. 総ページ数 24
3. 書名 小動物用PET、SPECTによる分子イメージング研究ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------