

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05753

研究課題名(和文) 親水性ホウ素クラスターを含有する分子標的型薬剤の設計と合成

研究課題名(英文) Development of Hydrophilic Boron Cluster Containing Molecular-Targeted Drugs

研究代表者

服部 能英 (Hattori, Yoshihide)

大阪公立大学・研究推進機構・特任講師

研究者番号：50514460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、診断と治療の両方に適用可能ないわゆる「セラノスティック」な薬剤の開発研究が進展し、特に新規ながん治療への適用をめざした研究が盛んに行われている。

本研究は、がんの診断だけでなく、低侵襲ながん治療として注目されているホウ素中性子捕捉療法(BNCT)に適用可能な多機能な薬剤の開発を目指すものである。このために、コア分子として、20面体のホウ素クラスター分子であるBSHを選択し、反応性に富むイオウ原子に「腫瘍集積性分子」とイメージングのための蛍光性分子等の「標識化分子」を導入したホウ素薬剤の分子設計と合成を行い、セラノスティックなBNCT用薬剤としての有用性の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がんの診断だけでなく、低侵襲ながん治療として注目されているホウ素中性子捕捉療法(BNCT)に適用可能な薬剤の開発を目指すものである。このためにホウ素12原子から構成されホウ素含有率の非常に高いスルホニオドデカボレートを用い、様々な腫瘍集積性分子へ多量のホウ素原子と蛍光分子を同時に導入する手法を確立した。さらに、本手法を用いて調製したホウ素化抗体は赤外蛍光を用いて薬剤分布を解析可能なセラノスティック型BNCT用薬剤として有望な化合物であることを明らかとした。

今後、本研究で開発された化合物群を活用することにより、有用なセラノスティック型BNCT用薬剤の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, research on the development of so-called "theranostic" agents applicable to both diagnosis and treatment has been progressing, especially with the aim of applying them to novel cancer therapies.

In this study, to develop multifunctional agents applicable not only to cancer diagnosis but also to boron neutron capture therapy (BNCT), which is attracting attention as a minimally invasive cancer therapy. For this purpose, we selected BSH, an icosahedral boron cluster molecule, as the core molecule, and designed and synthesized boron drugs by introducing "tumor targeting molecules" and "labeling molecules" such as fluorescent molecules for imaging into sulfur atoms, and evaluated their usefulness as theranostic BNCT drugs. The evaluation of the boron drug as a theranostic BNCT agent was elucidated.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：BNCT ホウ素クラスター セラノスティック

1. 研究開始当初の背景

ホウ素 中性子捕捉療法 (BNCT) は、腫瘍細胞に集積した ^{10}B -ホウ素原子が熱中性子と反応 (ホウ素中性子捕獲反応) して、発生する飛程の短い α 粒子や γ 線等の 2 次放射線によって腫瘍細胞のみを破壊するがん細胞選択的治療法である[1]。従って BNCT の治療効果は、第一義的には腫瘍内 ^{10}B -ホウ素濃度と中性子線強度を乗じた物理量積に依存している。これらの事から、BNCT の治療効果の推定と治療精度を向上させるには、腫瘍内ホウ素薬剤濃度を高めると同時に、腫瘍内動態を非侵襲的にイメージング化して評価し得るセラノスティックなホウ素薬剤の開発が望まれている。

腫瘍細胞や組織内で、 ^{10}B -ホウ素と熱中性子が衝突して捕獲反応が惹起されるためには、30 ppm 以上の ^{10}B -ホウ素を選択的に集積させる必要があり、これまでに多くのホウ素化合物が開発されてきたが、臨床実用されているのはボロン酸残基を有する BPA と籠型ホウ素クラスター構造の BSH (図 1) の 2 種類に止まる[2]。我々は新規なホウ素薬剤開発のホウ素源として、水溶性に

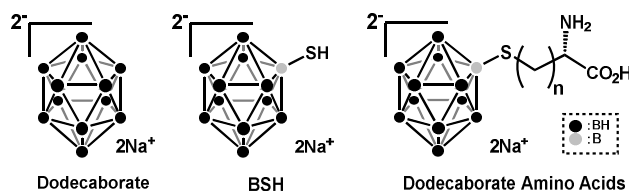


図 1 ドデカボレート誘導体

優れ、毒性が低く、分子内のホウ素含有率が高い BSH ($[\text{B}_{12}\text{H}_{11}]^{2-}\text{-SH}$) に着目し、反応性に富む側鎖のメルカプト基 (-SH) にアミノ酸などの腫瘍集積性有機分子を導入する手法を開発、合成したドデカボレート含有化合物が BNCT 用薬剤として有望な化合物であることを報告している[3]。しかし、BSH のドデカボレート部は、3 中心 2 電子結合に起因する -2 価の陰イオン性を帯び、表層が陰イオン性を帯びる腫瘍細胞の膜透過性が低下すると考えられ、ホウ素送達目的からは不利である。申請者らは、メルカプト基をスルフィド基 (-S-) を経る 2 段の化学修飾によりカチオン性のスルホニオ基 (-S⁺) に変換する合成法を考案 (図 2) した。カチオン性のスルホニル基によりドデカボレートの陰イオン性は -1 価に変化し、側鎖にスルホニオ基を有するドデカボレート含有化合物は、高い細胞膜透過性を示すことを明らかにした[4]。

これら実験結果から、我々は BSH のイオウ原子に異なる働きを示す 2 種類の機能性分子、例えば「腫瘍集積性分子」と「標識化分子」を導入した「スルホニオドデカボレート」類が、治療と診断の一体化を実現し得るセラノスティックな BNCT 用ホウ素薬剤のコア分子として非常に有用であると考えた。これまでに、多くの BNCT 用ホウ素キャリアー分子が報告されているが、これらの殆どがホウ酸基かドデカボレートをホウ素源として腫瘍指向性分子に導入したものであり、「スルホニオドデカボレート」構造を有するセラノスティックなホウ素薬剤に関する研究は報告されていない。

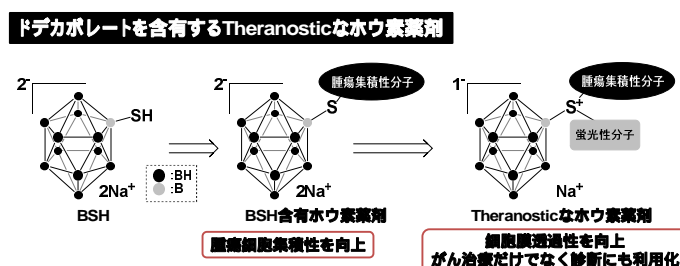


図 2 スルホニオドデカボレート誘導体の設計

2. 研究の目的

上述したような背景から、本研究では、BNCT によるがん治療とがん診断の一体化を可能とするセラノスティックな BNCT 用ホウ素薬剤の開発を目的に展開するものである。

20 面体構造を有する無機イオンである BSH を出発分子としてイオウ原子上に、「腫瘍集積性分子」と「標識化分子」を硫黄-炭素間結合の形成により導入した「スルホニオドデカボレート」は、水溶性の足場分子として、また、化合物ライブラリー構築のリード化合物のとして高いポテンシャルを有している。このスルホニオドデカボレート的一方へ、腫瘍に高発現する受容体や輸送系を標的とするアミノ酸やペプチド等の有機分子などのような「腫瘍集積性分子」を導入する。また、動態イメージングを可能とする「標識化分子」については、可視～近赤外蛍光を発する蛍光素子の導入し、腫瘍細胞内、組織内、あるいは生体内でのホウ素薬剤分布を可視化・定量できるようなセラノスティックな BNCT 用ホウ素薬剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、スルホニオドデカボレートに「腫瘍集積性分子」と「標識化分子」を導入したセラノスティック型 BNCT 用ホウ素薬剤の開発を目指すものである。腫瘍集積性分子としては、

先行研究の結果から、スルホニオドデカボレートを導入することで腫瘍細胞へ大量のホウ素を送達することが可能であった BPA や DPA-714 を選択した。また、より大きな分子としてミトコンドリア集積性ペプチドである RLA や、EGFR を標的とした抗 EGFR 抗体であるセツキシマブについても検討を行うこととした (図 3)。

一方、標識化分子としては、*in vitro*, *in vivo* など研究の様々な段階での要求に応えられる化合物群を設計・合成できることが望ましいと考えられる。そこで、青～近赤外蛍光を発する様々な蛍光特性を持った図 4 に示すような蛍光性分子を適宜選択して導入できるような手法を検討することとした。

このため、合成方法としては、まず腫瘍集積性分子へ BSH に導入し、その後に標識化分子の導入を行うこととした。

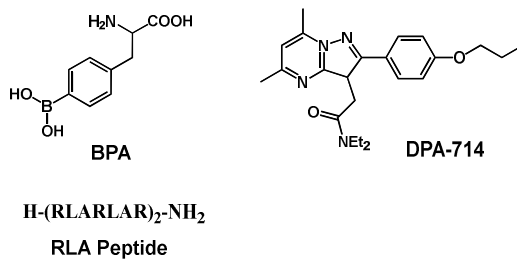


図 3 腫瘍集積性分子

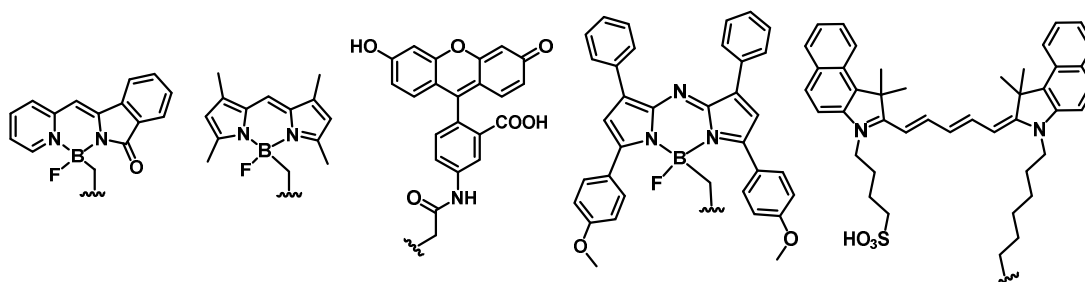


図 4 蛍光性分子

4. 研究成果

まず、BPA や DPA-714 のような小分子型の腫瘍集積性分子へ BSH を導入した後に、蛍光性分子として分子サイズの比較的小さい BODIPY を導入した誘導体について合成を行った (図 5)。しかし、種々の蛍光性分子を導入したスルホニオドデカボレート誘導体はいずれも水溶性が著しく低く、BNCT 用ホウ素薬剤としての評価を行うことが困難であった。

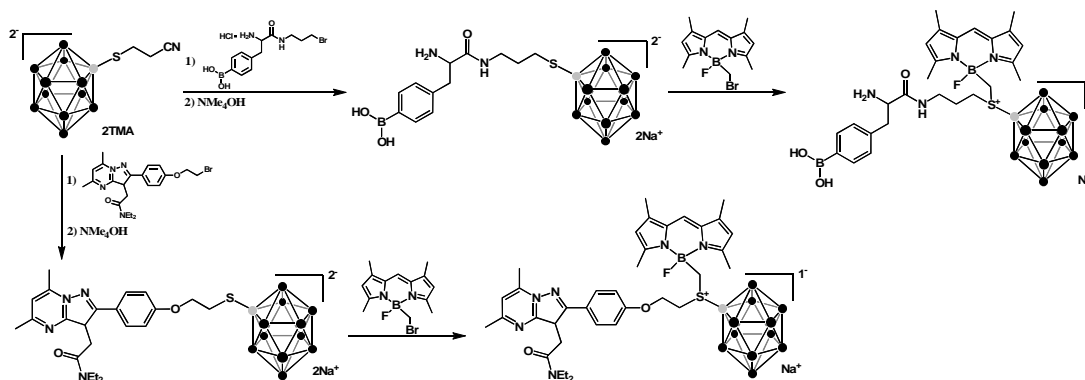


図 5 スルホニオドデカボレート誘導体の合成

このような結果から、蛍光性分子を導入しても水溶性をある程度保持できるよう、比較的小さいアルキル鎖やポリエチレングリコールなどの水溶性リンカーを介して腫瘍集積性分子を導入する必要があると考えられる。

そこで、カルボン酸やアジド基などのような反応性の高い官能基を末端に有する種々のリンカーと蛍光性分子を BSH に導入した誘導体群を合成し、これに腫瘍集積性分子を導入するという方法について検討を行うこととした。このような化合物群を開発することができれば、小分子だけでなく中・高分子型などの幅広い種類の腫瘍集積性分子をセラノスティック型 BNCT 用ホウ素薬剤の開発へと発展させることが可能となる。

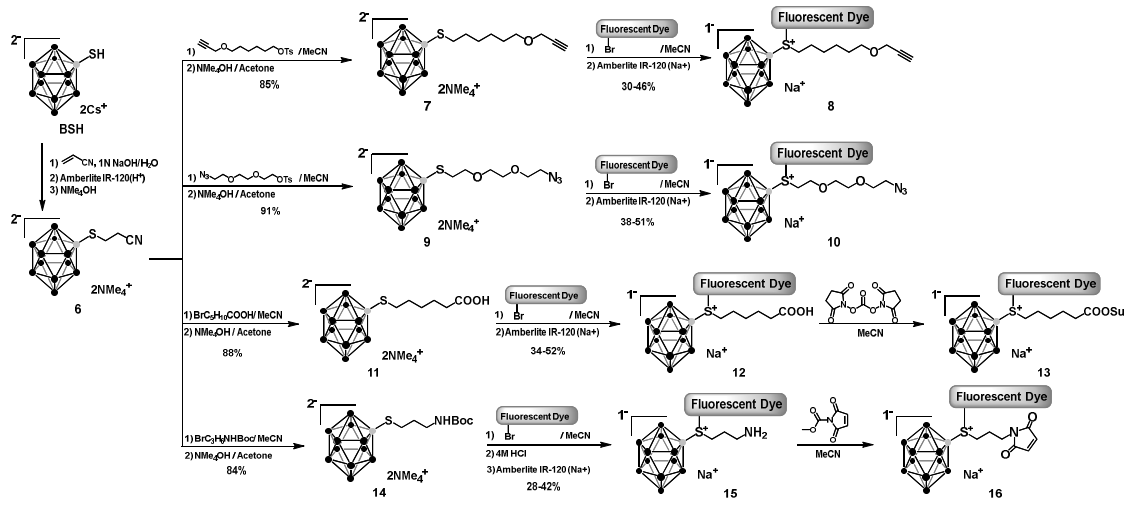


図6 反応性の高い官能基を有する蛍光型スルホニオドデカボレート誘導体の合成

このような考えから図6に示すように、BSHへカルボン酸、マレイミド、アジド、アルキンなどを末端に有するリンカーを導入した後に、種々の蛍光性分子を結合させた蛍光型スルホニオドデカボレート誘導体群の合成を行った。図5に示したのはその一例だが、リンカーの種類（アルキル鎖、ポリエチレングリコール鎖等）や鎖長などはその前駆体を調製することで任意に変更が可能であり、研究の目的に合わせて任意の誘導体を合成することが可能な手法を確立できたものと考えられる。

次に、このような研究の結果、合成することのできた蛍光型スルホニオドデカボレート誘導体の中で、近赤外蛍光を発する蛍光素子であるCy5.5を導入したCy5.5-DB-COOSu(13)を用いて、抗EGFR抗体であるセツキシマブへのドデカボレートの導入について検討を行った(図7)。この結果、スルホニオドデカボレート誘導体13を用いることで、セツキシマブに3~4分子程度のドデカボレートと近赤外蛍光分子を導入したCy5.5-DB-Cetの調製に成功した。

さらに、このCy5.5-DB-Cetについて、BNCT用ホウ素薬剤としての評価を行うために、腫瘍細胞への集積性試験と細胞内分布の解析を行った。

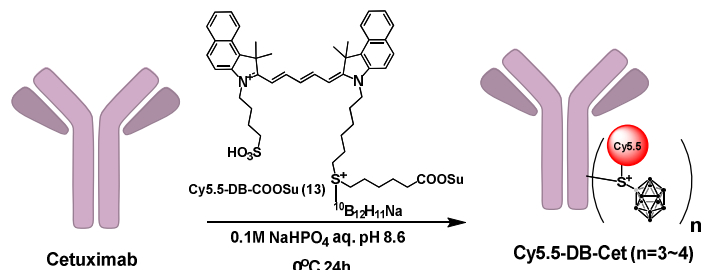


図7 抗EGFR抗体へのスルホニオドデカボレートの導入

図8に示すように、Cy5.5-DB-Cetは極めて低い暴露濃度(100nM)であってもA431細胞(EGFR高発現型ヒト上皮がん細胞)へ、大量のホウ素を送達することができ、また、Cy5.5-DB-Cetを暴露する際にEGFを共存させてEGFRを刺激することにより、さらに多くのホウ素をA431細胞に取り込ませることが可能であった。

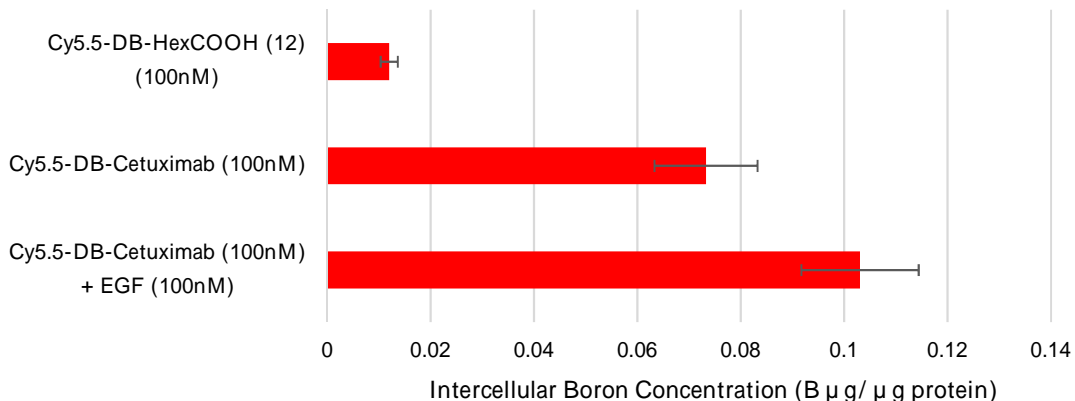


図8 ホウ素化セツキシマブのA431細胞への取り込み試験

さらに、細胞内分布についても検討を行った結果、Cy5.5-DB-Cet は、単独で暴露した場合には主に細胞膜上に集積するような分布を示すが、EGF 共存下では細胞内に内在化することが確認できた(図 9)。これらの特徴は、先行研究で開発したホウ素化セツキシマブと同様の挙動であり、本手法を用いることでセツキシマブの特性を損なうことなく、ドデカボレートにセツキシマブを導入することができたと考えられる[5]。そして、これらの結果から Cy5.5-DB-Cet は近赤外蛍光を用いて薬剤分布を解析可能なセラノスティック型 BNCT 用薬剤として有望な化合物であると期待でき、今後、*in vivo*での評価試験についても検討を行っていく予定である。

現在、本手法を用いて RLA ペプチドなどの中分子型腫瘍集積性分子を修飾することも確認している。さらに、BPA や DPA-714 の誘導体などのような小分子型の腫瘍集積性化合物へスルホニオドデカボレートを導入した水溶性の高いセラノスティック型 BNCT 用ホウ素薬剤の開発についても検討を進めている。

以上のような研究結果、本研究では、BNCT によるがん治療とがん診断の一体化を可能とするセラノスティックな BNCT 用ホウ素薬剤の開発するために、種々の蛍光発色団と反応性の高い官能基を、任意の水溶性/疎水性リンカーを介してスルホニオドデカボレートに導入したツール分子群を開発した。そして、このツール分子を用い、抗体などの生体高分子や中分子化合物あるいは小分子などにスルホニオドデカボレートと蛍光分子を同時に導入する手法を確立した。さらに、本手法を用いて調製した赤外蛍光を用いて薬剤分布を解析可能なセラノスティック型 BNCT 用薬剤として有望な化合物であるホウ素化セツキシマブ Cy5.5-DB-Cet を調製することに成功した。

今後、本研究で開発された化合物群を活用することにより、真に有用なセラノスティック型 BNCT 用薬剤の開発につながるものと期待できる。

< 引用文献 >

- [1] Barth R. F.; Coderre J. A.; Vicente M. G.; Blue T. E. Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects. *Clin. Canc. Res.*, 2005, 11, 3987-4002.
- [2] Soloway A. H.; Tjarks W.; Barnum B. A.; Rong F. G.; Barth R. F.; Codogni I. M.; Wilson J. G. The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chem. Rev.*, 1998, 98, 1515-1562.
- [3] Hattori Y.; Kusaka S.; Mukumoto M.; Uehara K.; Asano T.; Suzuki M.; Masunaga S.; Ono K.; Tanimori S.; Kirihata M. Biological Evaluation of Dodecaborate-Containing l-Amino Acids for Boron Neutron Capture Therapy. *J. Med. Chem.*, 2012, 55, 6980-6984.
- [4] Hattori Y.; Ishimura M.; Ohta Y.; Takenaka H.; Kirihata M. Dodecaborate conjugates targeting tumor cell overexpressing translocator protein for boron neutron capture therapy. *ACS. Med. Chem. Lett.*, 2021, 13, 50-54.
- [5] Nakase I.; Aoki A.; Sakai Y.; Ishimura M.; Takatani-Nakase T.; Hattori Y.; Kirihata M.; Antibody-based receptor targeting using an Fc-binding peptide-dodecaborate conjugate and macropinocytosis induction for boron neutron capture therapy, *ACS omega*, 2020, 5, 22731-22738.

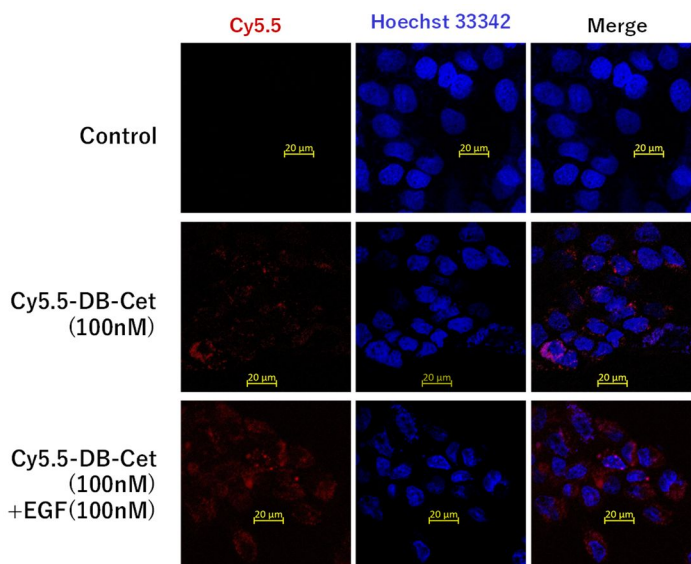


図 9 ホウ素化セツキシマブの細胞内分布解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kashiwagi Hideki, Hattori Yoshihide, Kawabata Shinji, Kayama Ryo, Yoshimura Kohei, Fukuo Yusuke, Kanemitsu Takuya, Shiba Hiroyuki, Hiramatsu Ryo, Takami Toshihiro, Takata Takushi, Tanaka Hiroki, Watanabe Tsubasa, Suzuki Minoru, Hu Naonori, Miyatake Shin-Ichi, Kirihata Mitsunori, Wanibuchi Masahiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Multi-Targeted Neutron Capture Therapy Combined with an 18 kDa Translocator Protein-Targeted Boron Compound Is an Effective Strategy in a Rat Brain Tumor Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15041034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Yoshihide, Ishimura Miki, Ohta Youichirou, Takenaka Hiroshi, Kawabata Shinji, Kirihata Mitsunori	4. 巻 13
2. 論文標題 Dodecaborate Conjugates Targeting Tumor Cell Overexpressing Translocator Protein for Boron Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 50 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00377	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 Hirase Shiori, Aoki Ayako, Hattori Yoshihide, Morimoto Kenta, Noguchi Kosuke, Fujii Ikuo, Takatani-Nakase Tomoka, Futaki Shiroh, Kirihata Mitsunori, Nakase Ikuhiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Dodecaborate-Encapsulated Extracellular Vesicles with Modification of Cell-Penetrating Peptides for Enhancing Macropinocytotic Cellular Uptake and Biological Activity in Boron Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1135 ~ 1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00882	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 Nakase Ikuhiko, Aoki Ayako, Sakai Yuriko, Hirase Shiori, Ishimura Miki, Takatani-Nakase Tomoka, Hattori Yoshihide, Kirihata Mitsunori	4. 巻 5
2. 論文標題 Antibody-Based Receptor Targeting Using an Fc-Binding Peptide-Dodecaborate Conjugate and Macropinocytosis Induction for Boron Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 22731 ~ 22738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c01377	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 Fukuo Yusuke, Hattori Yoshihide, Kawabata Shinji, Kashiwagi Hideki, Kanemitsu Takuya, Takeuchi Koji, Futamura Gen, Hiramatsu Ryo, Watanabe Tsubasa, Hu Naonori, Takata Takushi, Tanaka Hiroki, Suzuki Minoru, Miyatake Shin-Ichi, Kirihata Mitsunori, Wanibuchi Masahiko	4. 巻 9
2. 論文標題 The Therapeutic Effects of Dodecaborate Containing Boronophenylalanine for Boron Neutron Capture Therapy in a Rat Brain Tumor Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 437 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology9120437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Koji, Hattori Yoshihide, Kawabata Shinji, Futamura Gen, Hiramatsu Ryo, Wanibuchi Masahiko, Tanaka Hiroki, Masunaga Shin-ichiro, Ono Koji, Miyatake Shin-Ichi, Kirihata Mitsunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Synthesis and Evaluation of Dodecaboranethiol Containing Kojic Acid (KA-BSH) as a Novel Agent for Boron Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1551 ~ 1551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9061551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 服部 能英, 石村 美紀, 大田 洋一郎, 竹中 宏誌, 切畑 光統
2. 発表標題 セラノスティック型BNCT用薬剤開発のためのバイファクショナルなドデカボレート誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 服部 能英, 石村 美紀, 大田 洋一郎, 竹中 宏誌, 切畑 光統
2. 発表標題 Bifunctional Dodecaborate to Development of Theranostic Type Boron Carrier
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部 能英, 石村 美紀, 大田 洋一郎, 竹中 宏誌, 切畑 光統
2. 発表標題 蛍光型ホウ素センサーの開発とホウ素薬剤の動態解析
3. 学会等名 第18回日本中性子捕捉療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部 能英, 石村 美紀, 大田 洋一郎, 竹中 宏誌, 上原 幸樹, 浅野 智之, 切畑 光統
2. 発表標題 トランスロケータープロテイン (TSP0) を標的とした ドデカボレート含有化合物の BNCT用薬剤としての評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部 能英
2. 発表標題 ホウ素薬剤の細胞内分布とBNCT による殺細胞効果への影響
3. 学会等名 京都大学複合原子力科学研究所専門研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihide Hattori
2. 発表標題 Development of Dodecaborate Containing Amino Acid Derivatives for BNCT
3. 学会等名 2020 Taiwan-Japan BNCT International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------