

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19590102  
 研究課題名(和文) 中性子捕捉療法のための新生血管を標的とする能動的標的指向ボロンキャリアの分子設計  
 研究課題名(英文) Design and synthesis of active targeting boron carriers to tumor vascularization for boron neutron capture therapy  
 研究代表者  
 永澤 秀子 (NAGASAWA HIDEKO)  
 岐阜薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号： 90207994

研究成果の概要：硼素中性子捕捉療法(BNCT)の治療効果を向上させるために、固形がん微小環境における新生血管を標的とした腫瘍標的化ボロンキャリアの開発を行った。能動的標的指向化(active targeting)ユニットとして種々のがん細胞や新生血管に高発現している $\alpha\beta 3$  インテグリン受容体リガンドの環状 RGD ペプチドと種々のボロンクラスタのハイブリッド分子を設計・合成し、体内動態を解析した。その結果、臨床適用されているボロンクラスタである BSH に比べて、腫瘍内濃度、腫瘍滞留時間及び血液・腫瘍内濃度比の改善が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品分子設計、中性子捕捉療法、ボロンキャリア、インテグリン受容体、RGD

## 1. 研究開始当初の背景

(1) BNCT は正常細胞等をほとんど傷つけることなく、腫瘍細胞のみを選択的に破壊することを可能とする理想的ながん治療法と考えられる。しかし、現在臨床で使用されているボロンキャリアである sodium borocaptate (BSH) は腫瘍への取り込み、中でも腫瘍内低酸素領域への取り込みが低いと考えられ、十分にその優位性を発揮できていない。

(2) がん組織の特性としてがん微小環境に着目して、これを標的としたがん治療薬を開発する。特に新生血管で高発現しているインテグリン受容体に親和性を有するボロンキ

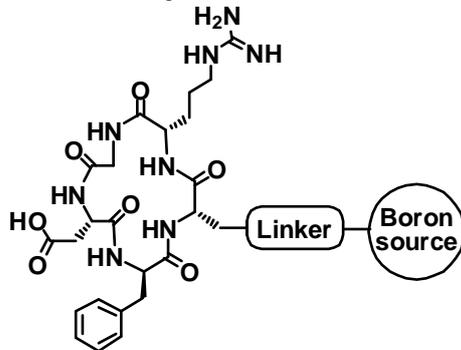
ャリアの開発により、 $^{10}\text{B}$  の能動的かつ効率的な腫瘍標的化が可能になると期待される。

## 2. 研究の目的

硼素中性子捕捉療法(BNCT)の治療効果の向上を目指して、低酸素・低栄養な固形がん微小環境において特異的に誘導される新生血管を標的とした腫瘍標的化ボロンキャリアを分子設計・合成する。マウスモデルにおける体内動態及び腫瘍組織内動態を検討し、構造活性相関を行うことで腫瘍低酸素微小環境を標的化する新規な薬物送達制御デバイスの確立をめざす。

### 3. 研究の方法

(1) 分子設計：ホウ素原子の腫瘍選択的送達のために、Integrin  $\alpha_v\beta_3$  を標的としたボロンキャリアの設計を行った。分子認識ユニットとして、環状 RGD ペプチドの導入を計画した。また、疎水性バランスを制御する最適なリンカーと、種々のホウ素含有分子を組み合わせることで、体内動態をコントロールできると考え、Fig. 1 に示すハイブリッド分子



を設計した。

Fig. 1

ホウ素はその特有の物理的性質から、多様な高次クラスタを形成することが知られており、その中でも、20 面体構造をもつものは特に物理的、化学的に安定で、いくつもの合成法、反応性が研究されている。BNCT では、腫瘍組織中のホウ素濃度が重要であるため、ホウ素含有分子としてこのようなクラスタを用いることで、1 分子あたりのホウ素量を増加させることができる、ボロンクラスタを分子に組み込むこととした。(Fig. 2) また、環状ペプチドとリンカーの接続は、リンカーの末端をカルボン酸とし、また、環状ペプチドにリジンを導入し、その側鎖アミノ基とアシル化して結合させることとした。

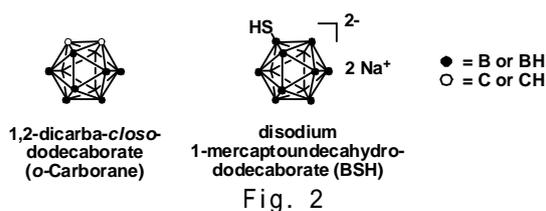


Fig. 2

#### (2) 合成

直鎖保護ペプチドの合成は Fmoc 固相合成法を用いて行った。環化、脱保護して得られた環状ペプチドは、LC/ESI-MS にて同定し、分取用 HPLC、または逆相カラムクロマトグラフィーにて精製した。

リンカーを有するボロンクラスタ誘導体を合成し、環状 RGD ペプチドとの種々号を行った。

#### (3) 物性及び細胞毒性

RP-HPLC にて疎水性の解析を行った。

Hct116 細胞を用いて Calcein AM アッセイにより細胞毒性を評価した。

血清中の安定性に関して、LC/ESI-MS で解析した。

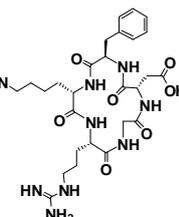
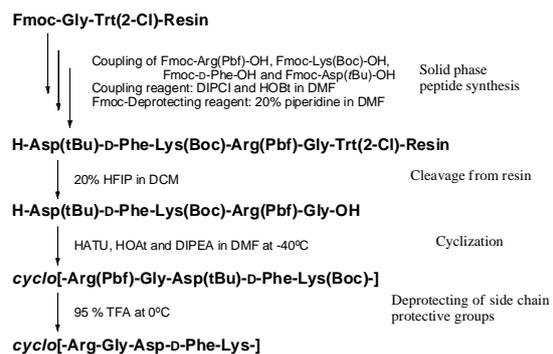
#### (4) 体内動態

各化合物を 10 % HP- $\beta$ -CD 溶液に溶解し、SCCVII を下腿に移植した C3H/He マウスに 0.75mmol/kg ずつ静脈注射して、経時的に組織を採取した。組織に 70 % HClO<sub>4</sub> / 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:2 の溶液を加え、75 °C で 24 時間インキュベートした。これらの抽出液について、ICP-AES (Induced Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry) でホウ素濃度を定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) 環状ペプチドの合成

直鎖保護ペプチドの合成は Fmoc 固相合成法を用いて行った。次いで、HATU/HOAt を用いて環化、得られた環状保護ペプチドを 95 % TFA にて側鎖保護基を除き、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製し、目的の環状ペプチド *cyclo*[RGDfK] 1 を 62 % の収率で得た (Scheme 1)。得られたペプチドは、LC/ESI-MS にて同定し、分取用 HPLC、または逆相カラムクロマトグラフィーにて精製した。



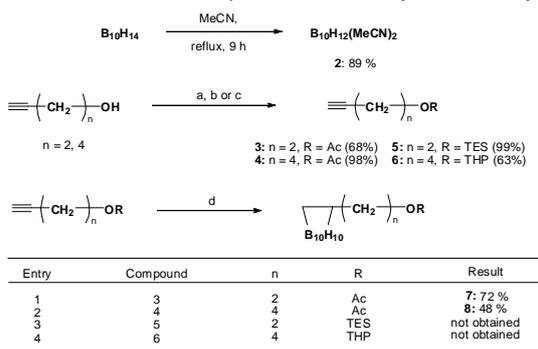
1: *cyclo*[RGDfK] (62%)

Scheme 1

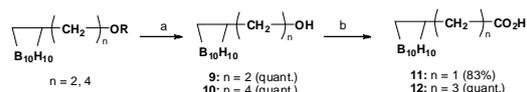
#### (2) o-carborane 誘導体の合成

Decaborane (B<sub>10</sub>H<sub>14</sub>) をアルゴン雰囲気下、無水アセトニトリル中で加熱還流して、B<sub>10</sub>H<sub>12</sub>(MeCN)<sub>2</sub> 2 を 89 % の収率で得た。これをベンゼン、またはトルエン中、種々の末端アルキンを有する化合物と反応させた。すなわち、3-butyn-1-ol もしくは、5-hexyn-1-ol に保護基を導入し、2 と反応して o-carborane 誘導体を得た。得られた acetyl 体 7, 8 を塩基性条件下、methanol による加溶媒分解によって、アルコール体 9, 10 へと脱保護し、続く HClO<sub>4</sub> / cat. CrO<sub>3</sub> による酸化により、対応

するカルボン酸 **11**, **12** を得た。(Scheme 2)



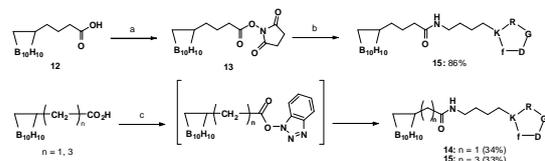
Reagent and Conditions: (a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , TEA, DMAP; (b) TESI, Imidazole, DMF; (c) DHP, TsOH, DCM; (d)  $\text{B}_{10}\text{H}_{12}(\text{MeCN})_2$ , toluene, reflux.



Reagent and Conditions: (a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$  (10:1); (b)  $\text{H}_2\text{IO}_6$ , cat.  $\text{CrO}_3$ , wet MeCN

Scheme 2

得られたカルボン酸は、活性エステル体 **13** へと変換、もしくは、TBTU/HOBt を用いて *in situ* で活性化した後、塩基性条件下、環状ペプチド **1** のリジン側鎖と反応させ、**14**: GPU-48, **15**: GPU-49 を得た (Scheme 3)。得られた化合物は、LC/ESI-MS にて同定し、分取用 HPLC にて単離精製した。



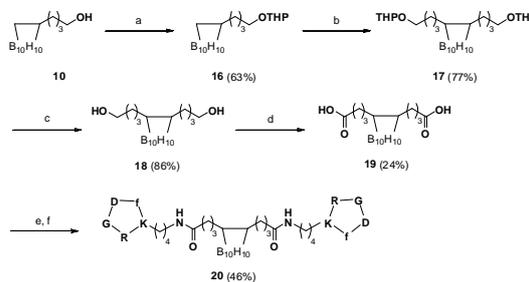
Reagent and Conditions: (a) HOSu, EDCI-HCl, DCM; (b) 1, DIPEA, DMF; (c) TBTU, HOBt, DIPEA, DMF, rt, then 1, DIPEA, rt.

Scheme 3

次に、BSH の誘導体の合成を行った。BSH は 2 価のジアニオン体で存在しており、1 位にメルカプト基を有している。本来、BSH そのものが BNCT で用いられているが、細胞毒性は低いものの、腫瘍選択性、組織選択性が高くなく、改善の余地がある。リンカーの選択としては、求核性の高い BSH のメルカプト基によるマレイミドへのマイケル反応を利用してモノアルキル化を行うことができることから、マレイミド基を有するリンカーを導入した。

アルコール体 **10** を dichloromethane 中、tosylic acid を触媒として 3,4-2*H*-dihydropyran と反応させ、THP 保護体 **16** を得た。**16** のカルボラン部分の C-H を *n*-BuLi を用いて脱プロトン化、リチオ化し、2-(4-chlorobutoxy)tetrahydropyran と反応させることで、1,2-bis[4-(2-tetrahydropyranyloxy)butyl]-*o*-carborane **17** を得た。**17** は HCl にて脱保護され、対応するジオール体 **18** を得たのちに、 $\text{HClO}_4$  / cat.  $\text{CrO}_3$  による酸化を行い、対応するジカルボン酸 **19** へと変換した。得られたジカルボン酸 **19** は、

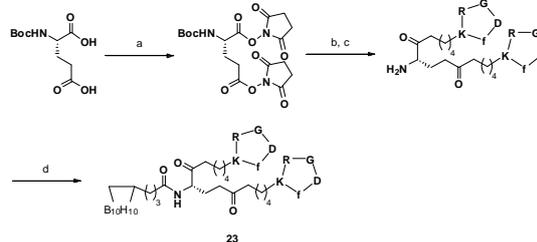
HOSu, EDCI-HCl を用いて活性エステル体にした後に、塩基性条件下、DMF 中、環状ペプチド **1** と反応させ、目的とする **20**: GPU-201 を得た (Scheme 4)。得られた化合物は、LC/ESI-MS にて同定し、分取用 HPLC にて単離精製した。



Reagent and conditions: (a) 3,4-2*H*-dihydropyran, TsOH, DCM, rt; (b) 1, *n*-BuLi, THF/PHH, -78°C, then rt; 2, 2-(4-chlorobutoxy)tetrahydropyran, 0°C, then reflux; (c) 4*M* HCl in 1,4-dioxane, MeOH, rt; (d)  $\text{H}_2\text{IO}_6$ , cat.  $\text{CrO}_3$ , wet MeCN; (e) HOSu, EDCI-HCl, DCM, rt; (f) 1, DIPEA, DMF, rt.

Scheme 4

また、同一分子内に 2 つの cyclic peptide を有する化合物を合成した。まず、Boc-Glu-OH を出発原料とし、HOSu, EDCI-HCl を用いて、活性エステル体 **21** を得た。**21** を DIPEA 存在下、cyclic peptide **1** と反応させ、続く 95%TFA を用いた脱保護により、 $\text{E}[\text{c}(\text{RGDFK})]_2$  **22** を合成した。**22** と **13** を塩基性条件下、DMF 中で反応させることにより、目的とする化合物 **23**: GPU-189 を得た (Scheme 5)。得られた化合物は、LC/ESI-MS にて同定し、分取用 HPLC にて単離精製した。



Reagent and conditions: (a) HOSu, EDCI-HCl, DCM, rt; (b) 1, DIPEA, DMF; (c) 95%TFA, rt; (d) 13, DIPEA, DMF, rt.

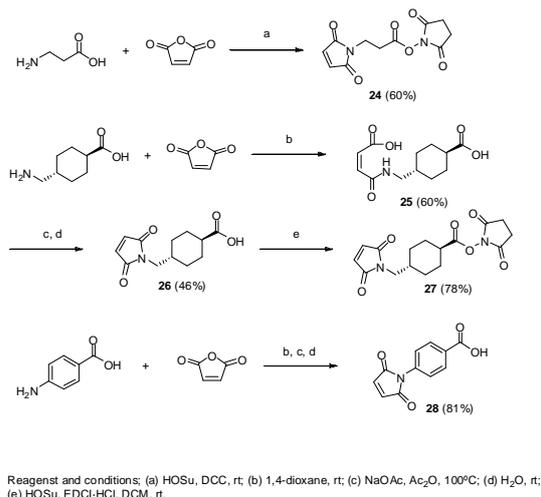
Scheme 5

### (3) BSH 誘導体の合成

BSH は 2 価のジアニオン体で存在しており、1 位にメルカプト基を有している。本来、BSH そのものが BNCT で用いられているが、細胞毒性は低いものの、腫瘍選択性、組織選択性が高くなく、改善の余地がある。

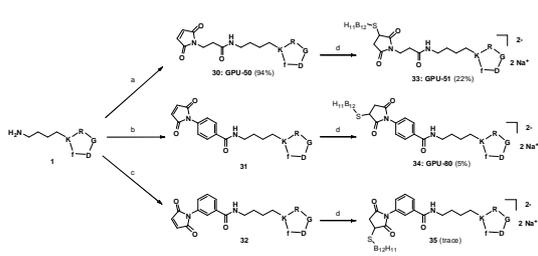
求核性の高い BSH のメルカプト基によるマレイミドへのマイケル反応を利用してモノアルキル化を行うことができることから、マレイミド基を有するリンカーを導入した。すなわち、リンカーの合成を行った。maleic anhydride,  $\beta$ -alanine, HOSu を DCC 存在下、DCM 中で反応させることで、目的とする *N*-succinimidyl 3-(*N*-maleimido)propanoate **24** を一工程で合成することができた。さらに maleic anhydride と tranexamic acid を 1,4-dioxane 中、室温で反応させ、中間体 **25**

を得た後、sodium acetate 存在下 acetic anhydride を用いて環化することで、*trans* 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane carboxylic acid **26** を得た。次いで、得られたカルボン酸を HOSu, EDCI·HCl を用いることで、対応する活性エステル体 **27** を得た。同様に、基質を 4-aminobenzoic acid にかえて反応を行った。maleic anhydride と 4-aminobenzoic acid を 1,4-dioxane 中、室温で反応させた後、sodium acetate 存在下 acetic anhydride を用いて環化することで、目的とする 4-(*N*-maleimido)benzoic acid **28** を得た (Scheme 6)。



Scheme 6

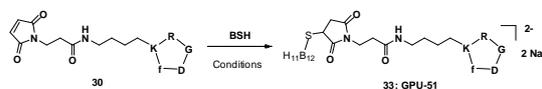
cyclic peptide **1** とリンカー **24** を DIPEA 存在下、DMF 中、室温にて攪拌し、対応する化合物 **30** を得た。本反応溶媒に水/アセトニトリル系を用いて塩基存在下行った場合、イミドの開環反応が進行することが LC/ESI-MS にて観察された。リンカー **28** については HATU/HOAt/DIPEA を、**29** については DIPICl/HOBt をそれぞれ用いて化合物 **31**、**32** を得た。これらのマイケルアクセプターを有する化合物は DIPEA 存在下、BSH と反応させたが、いずれの反応も低収率 (**33**: 22%、**34**: 5%) または痕跡量 (**35**) 得られるのみであった。(Scheme 7)。化合物の同定は LC/ESI-MS を用いて行った。興味深いことに、目的の化合物のマススペクトルの base ion peak は [M]<sup>2-</sup> ではなく、[M+H]<sup>-</sup> として観察された。



Reagent and conditions; (a) 24, DIPEA, DMF, rt; (b) 28, DIPICl, HOBt, DMF, rt; (c) HATU, HOAt, DIPEA, DMF, rt; (d) BSH, DIPEA, DMF.

Scheme 7

反応のスケールアップをする際、収率の改善が必要であると考えられたため、種々の条件にて **30** と BSH を結合して、**33** を合成する検討を行った (Table 1)。



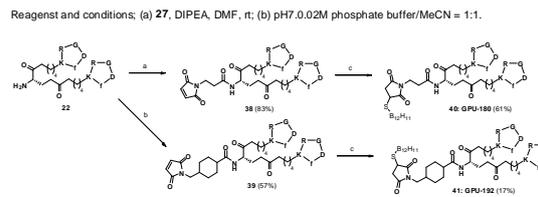
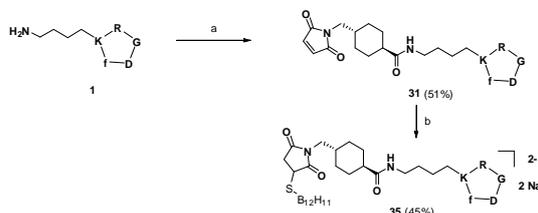
Entry	Solvent	Additive	Yield (%)
1	DMF	DIPEA	22 <sup>a</sup>
2	MeOH/water = 2:1	—	32 <sup>a</sup>
3	pH7.0.02M phosphate buffer/MeCN = 4:1	—	0 <sup>a</sup>
4	pH7.0.02M phosphate buffer/MeCN = 1:1	—	17 <sup>b</sup>
5	pH7.0.02M phosphate buffer/MeCN = 1:1	—	74 <sup>b</sup>

(a) Purified with pHPLC using ODS column. (b) Purified with Waters OASIS HLB column.

Table 1

まず、DIPEA/DMF の塩基性条件にて反応を行い、preparative HPLC を用いて分離を行った場合、目的の化合物が 22% の収率で得られた。次に、メタノール/水混合溶媒にて反応を行った。この場合、反応収率の若干の向上が見られたが、低収率に終わった。また、pH7.0.02M phosphate buffer/MeCN を塩基、兼溶媒として用いた場合、buffer/MeCN を 4:1 では反応液が懸濁し、反応は進行しなかったが、混合比を 1:1 とした場合、均一に溶解し、原料のペプチドの消失を確認した。次いで、ODS HPLC にて分取したが、目的の化合物は 17% の収率であった。そこで styrene-DVB-vinylpyrrolidone 系の樹脂である OASIS HLB を用いた精製の検討を行ったところ、74% と単離収率の劇的な改善が見られた。

リンカー **27** についても、DIPEA 存在下、cyclic peptide **1** と反応させ、**36** を得た後、同様の反応条件にて BSH との反応を行うことで、目的の化合物 **37** を中程度の収率で得た。リンカー **24**、**27** については、E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> **22** と結合させて、対応する化合物 **38**、**39** を得た後、上記の条件を用いて BSH と反応させ、目的とする化合物 **40**、**41** を得た。得られた化合物は、LC/ESI-MS にて同定し、分取用 HPLC にて単離精製した。(Scheme 8)



Scheme 8

(4) 血清中の安定性試験

合成した化合物の生体内での安定性を *in vitro* で検証する目的で、代表的な化合物について、血清内での安定性を調べた。

cyclic peptide と GPU-51 はインキュベート開始 12 時間以内では血清内で非常に安定であることを示唆する結果となった (Figure 3, 4)。

Fig. 3

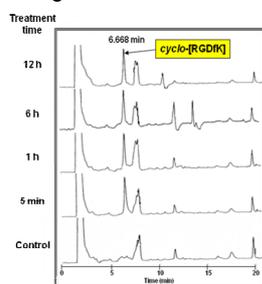


Fig. 4

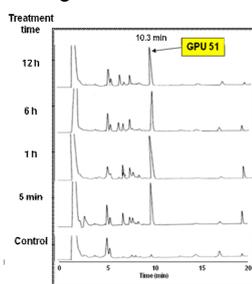
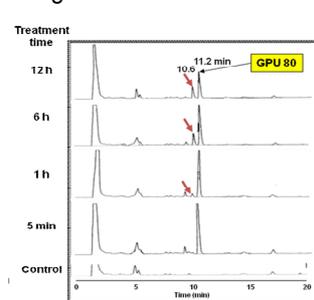


Fig. 5



一方、GPU-80 はインキュベート開始 1 時間後から、11.2min に表れる GPU-80 のピークとは別の 10.6min に見られる分解物由来と考えられるピーク

が出現し始め、時間の経過とともに徐々に増加していった。同時に、GPU-80 のピーク強度は減少していった (Figure 5)。

#### (5) HCT116 細胞における細胞毒性

GPU-49 に若干の細胞毒性が認められたが、その他の化合物は、ほとんど毒性を示さなかった。(Table 2)

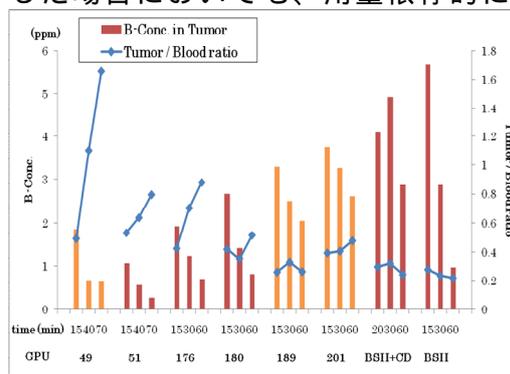
Table 2

compound	IC <sub>50</sub>	100μM viability %
GPU-49	66.97±3.40	32 ± 3%
GPU-51	>100	91 ±18%
GPU-176	>100	80 ± 4%
GPU-180	>100	95 ±11%
GPU-189	>100	76 ±12%
GPU-192	>100	87 ± 3%
GPU-201	>100	75 ±13%
BSH	>100	86 ±10%

#### (6) 体内動態

組織抽出液のホウ素濃度を ICP-AES で測定した。この方法では、誘導結合プラズマに

より、種々の原子特有の発光スペクトルを定量することで、放射線同位体を用いることなく、高感度な定量ができる。Fig.6 に示すように、RGD ペプチドが 1 つのもの (GPU-49, 51, 176) よりも、2 つ結合しているもの (GPU-180, 189, 201) の方が腫瘍組織への分配が良好であった。オレンジの棒グラフで示しているカルボラン誘導体は、茶色で示す BSH 誘導体、もしくは BSH そのものよりも腫瘍組織内での保持が優れていることが分かる。また、T/B に関しては、BSH よりも GPU-201 の方が優れていた。腫瘍内ホウ素濃度、腫瘍内滞留性、T/B を総合的に判断すれば、今回合成した化合物の中では、GPU-201 が最も優れていると考えられる。さらに GPU-201 を腹腔内投与した場合においても、用量依存的に腫



瘍内取り込みの向上が認められた。

Fig. 6 Biodistribution of boron carriers

#### (総括)

o-carborane または BSH に各種リンカーを介して環状 RGD ペプチドを導入した種々のボロンキャリアを合成した。このうち、環状 RGD ペプチド基を 2 つ導入した o-carborane 誘導体 GPU-201 において、0.75 mmol/kg を静脈注射した時、BSH と同等またはそれ以上の腫瘍内濃度と腫瘍滞留時間が認められた。さらに腹腔内投与に於いても、用量依存的に腫瘍内取り込みの向上が認められた。血液/腫瘍内濃度比が BSH よりも優れていたことから、本化合物は新規な能動的標的指向ボロンキャリアとして有望と考えられた。現在、担がんマウスによる中性子捕捉療法実験とインテグリン受容体親和性試験を検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Kizaka-Kondoh S., Nagasawa H.; Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. (2009). 査読有, *Cancer Science*, 100, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01195.x

2. Ueda S., Nagasawa H., Copper-catalyzed synthesis of benzoxazoles via a regioselective C-H functionalization/C-O bond formation under an air atmosphere.(2009). 査読有, *J. Org. Chem.*, 74, 4272-4277.
  3. Miyake K., Uto Y., Nagasawa H. /8, Hori H. et al.; The novel hypoxic cell radiosensitizer, TX-1877 has antitumor activity through suppression of angiogenesis and inhibits liver metastasis on xenograft model of pancreatic cancer.(2008). 査読有, *Cancer Letters*, 272, 325-335.
  4. Nakashima H., Uto Y., Nakata E., Nagasawa H. /14, Hori H. et al. ;Synthesis and biological activity of 1-methyl-tryptophan-tirapazamine hybrids as hypoxia-targeting indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors.(2008). 査読有, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 8661-8669.
  5. Nakayama S., Uto Y., Nagasawa H. /15, Hori H. et al.; TX-2152: a conformationally rigid and electron-rich diyne analogue of FTY720 with in vivo antiangiogenic activity.(2008). 査読有, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 7705-7714.
  6. Paulino N., Abreu S.R., Uto Y., Nagasawa H. /10, Hori H. et al., Bretz W.;Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis.(2008). 査読有, *European Journal of Pharmacology*, 587, 296-301.
  7. Masunaga S., Nagasawa H. /8, Uto Y., Hori H., Ono K., Dependency of the effect of a vascular disrupting agent on sensitivity to tirapazamine and gamma-ray irradiation upon the timing of its administration and tumor size, with reference to the effect on intratumor quiescent cells., (2007). 査読有, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 133, 47-55, [学会発表](計 13 件)
    1. Kimura S., Inaba Y., Kawamura Y., Masunaga S., Ueda S., Okuda K., Nagasawa H., Development of new tumor targeting 10B-carrier: Boron cluster-cyclic RGD pentapeptide conjugates for boron neutron capture therapy., AACR 2009, Colorado Denver, April 2009
    2. 岡部泰之, 奥田健介, Bahaa YOUSSEF, 近藤科江, 上田聡, 永澤秀子, 低酸素イメージングを目指す近赤外蛍光バイオプローブの開発, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009 年 3 月
  3. 三原法秀, 林慧, 岡部泰之, 上田聡, 奥田健介, 永澤秀子, 宇都義浩, 堀均, 交差共役ケトン骨格を有する抗腫瘍性血管新生阻害剤の構造活性相関, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009 年 3 月
  4. 林慧, 三原法秀, 岡部泰之, 上田聡, 奥田健介, 永澤秀子, 加来田博貴, 松永望, 原英彰, チアゾリジンジオン骨格を有する新規選択的血管新生阻害剤 GPU-4 の開発, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009 年 3 月
  5. 服部久範, 野田美奈絵, 上田聡, 奥田健介, 永澤秀子, 低酸素応答を標的としたブラジル産プロボリスの成分探索, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009 年 3 月
  6. 奥田健介, 岡部泰之, 上田聡, 永澤秀子, 近藤科江, 低酸素領域を可視化する新規近赤外蛍光プローブの分子設計, 第 11 回がん治療増感研究シンポジウム, 奈良, 2009 年 2 月
  7. 永澤秀子, 林慧, 三原法秀, 岡部泰之, 上田聡, 奥田健介, 加来田博貴, 松永望, 原英彰, チアゾリジンジオン骨格を有する新規選択的血管新生阻害剤の開発, 第 6 回がんハイポキシア研究会, 広島, 2008 年 11 月
  8. Nagasawa H., Hayashi K., Okabe Y., Suto T., Mihara N., Ueda S., Kakuta H., Design, synthesis, and biological evaluation of cyclic imide derivatives as new potent angiogenesis inhibitors., AACR 2008, San Diego, April 2008 [図書](計 3 件)
    1. 宇都義浩, 中田栄司, 永澤秀子, 堀均, ハイポキシアを標的とした抗癌剤, 実験医学, 羊土社, 27(2), 305-311, 2009.
    2. 永澤秀子, 低酸素標的薬, 実験医学, 用度者, 25(14), 2151-2157, 2007.
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
永澤 秀子 (NAGASAWA HIDEKO)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90207994
  - (2)研究分担者  
上田 聡 (UEDA SATOSHI)  
岐阜薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 50453056
  - (3)連携研究者  
増永 慎一郎 (MASUNAGA SHIN-ICHIRO)  
京都大学・原子炉実験所・準教授  
研究者番号: 80238914