

令和元年6月7日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19858

研究課題名(和文) ホウ素中性子捕捉療法を可能とする新規ホウ素含有シアニン系色素の開発

研究課題名(英文) Development of novel boron-containing cyanine dyes for boron neutron capture therapy

研究代表者

尾江 悟 (ONOE, Satoru)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90756107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、がんが集まる性質をもつホウ素含有薬剤を投与した後、熱中性子線をがん照射することによって発生するα線を照射してがん細胞を破壊する新しいがん治療法である。この研究では、がんが集積する性質を持つシアニン系の蛍光色素にホウ素含有構造を導入することによって、BNCT適用可否の診断とBNCTによる治療の両方が可能なホウ素含有薬剤の開発を目指した。その結果、合成した化合物が、近赤外領域の光を吸収し、同領域の蛍光を発すること、アルブミンに対して結合親和性を持つこと、また、がん組織に集積することを見出し、ホウ素含有薬剤として有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BNCTでは、その治療を開始する前に適用の可否の診断をすることが有用であると知られている。しかし、現在臨床試験で使用されている診断薬は、治療に使われているホウ素含有化合物に放射性同位元素を導入した化合物であるため、診断に専用の施設を必要とする。この研究で新たに開発したホウ素含有化合物は、放射性同位元素を含んでいないことから、診断から治療に至るまで、専用の施設を必要としないBNCT用薬剤となり得る。本研究成果はより多くの施設でBNCTを実施できる可能性を示すものであり、引き続き臨床利用に向けて研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is a novel cancer therapy which destroys tumor cells using alpha particles produced by irradiation of low energy thermal neutrons to tumor after boron-containing therapeutic agents which accumulate in tumor. This study aimed at the development of boron-containing agents which enable both diagnosis and treatment for BNCT. We introduced boron-containing moieties into near infrared emissive cyanine dyes for in vivo non-invasive imaging. As a result, the novel compound synthesized for this study absorbed light and emitted fluorescence in the near infrared region, had binding affinity to albumin, and accumulated in tumor region in the in vivo study. These results suggest that the compound is a promising boron-containing diagnostic and therapeutic agent for BNCT.

研究分野：放射薬品化学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 インビボ蛍光イメージング EPR効果 放射性医薬品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy; BNCT) は、がんを集積性を示すホウ素含有薬剤を投与した後、人体に与える影響が小さい熱中性子線をがんに照射して $\alpha$ 線を発生させることで、がんを破壊する方法である。ホウ素含有薬剤をがんに選択的に集めることができれば、正常な細胞にダメージを与えることなくがんの治療を行うことができるため、新しいがん治療法として注目されている。

これまでに *p*-boronophenylalanine (BPA) を用いた BNCT の臨床試験が行われており、さらに、放射性同位元素である  $^{18}\text{F}$  を BPA に導入した化合物 (FBPA) を用いた PET 検査をすれば BNCT の治療を開始する前に BNCT で治療が可能かどうかを判断することができることが報告されている。しかし FBPA を用いた診断の問題点として、BPA と FBPA の体内動態が違う可能性があること、FBPA は放射性同位元素を含むためその扱いには専用の施設を必要とすることなどが挙げられている。

研究代表者はこれまでに、専用施設等を必要とせず、また、高感度で非侵襲的に検査することができるインビボ蛍光イメージング (OI) に利用可能なシアニン系色素を報告してきた。このシアニン系色素は、体内に投与した後に血中タンパク質であるアルブミンに結合して、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果によって、がんを高集積する蛍光色素である。このがん集積性のシアニン系色素に、その特性を損ねることがないようにホウ素含有構造を導入することができれば、BNCT 適用可否の診断から治療までを同一の化合物で行うことができる、有用な BNCT 用薬剤となると考え、その開発研究を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究は、がん高集積性を示すシアニン系色素を誘導体化し、BNCT の適用可否の診断と治療ができる新しいホウ素含有薬剤の開発を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 体外からの検出が可能な新規がん高集積性ホウ素含有薬剤の設計・合成

静脈内投与後にアルブミンに結合して EPR 効果によってがんに集積するシアニン系近赤外蛍光色素にホウ素含有構造を導入することで、OI で追跡が可能な BNCT 用薬剤を開発することを試みた。図 1 の設計概念図に示すように、シアニン系色素にリンカーを介して BPA 類似構造を導入した化合物 A と化合物 A のボロン酸に保護基として最も汎用されているピナコールを導入した化合物 B を設計した。

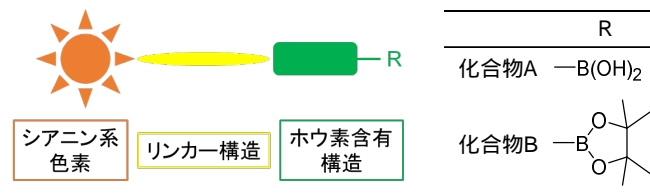


図 1. 新規ホウ素含有シアニン系色素の設計概念図

### (2) アルブミンに対する結合親和性の評価

ヒト血清アルブミン (HSA) を溶解したリン酸緩衝液 (PBS) に化合物 B を添加し、静置した。蛍光強度を測定した後、結合定数 ( $K_b$  値) を算出した。

### (3) 分光学的特性の評価

化合物 B を 5 g/dL HSA を溶解した PBS 溶液 (HSA 溶液) に加えた。得られた溶液について、紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。

### (4) がん細胞移行性に関する評価

HeLa 細胞を解離した後、培地で細胞を懸濁した。この細胞懸濁液に、化合物 B を添加し、37°C で培養した。その後、培地、PBS で順次細胞を洗浄し、PBS で細胞を懸濁した溶液について蛍光強度を測定した。なお、HeLa 細胞の懸濁液に化合物を添加せずに、同様の操作を行って得られた細胞懸濁液をコントロールとして用いた。

### (5) 担がんモデルマウスを用いた体内動態評価

右下肢に HeLa 細胞を皮下投与した Balb/c *nu/nu* マウス (担がんモデルマウス) を蛍光撮像実験に用いた。化合物 B を 5% ブドウ糖注射液に溶解し、この溶液を担がんモデルマウスに尾静脈より投与した。イソフルラン吸入麻酔下で経時的に蛍光撮像した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 体外からの検出が可能な新規がん高集積性ホウ素含有薬剤の設計・合成

化合物 A と化合物 B について逆相 HPLC で精製した直後に純度検定を行った。化合物 A は精製後も関わらず複数のピークが認められたが、化合物 B は 99% の高い純度で得られた。これらの結果は、化合物 A が不安定で単離が困難であること、また、化合物 A のボロン酸をピナコールエステル化することでホウ素含有化合物の安定性を向上できることが示唆された。

以上のことから、以降の実験では化合物 B についてのみ実施した。

##### (2) アルブミンに対する結合親和性の評価

1. 研究開始当初の背景で述べた通り、アルブミンへの結合は新規ホウ素含有化合物のがん集積性に重要な因子の一つである。そこで、新規ホウ素含有化合物のアルブミンに対する結合親和性の算出を行った。化合物 B は研究代表者が以前に報告したがん集積性シアニン系色素と同等の結合親和性を有することが示された。

以上の結果から、化合物 B は静脈内投与後にアルブミンに結合し、がん集積する可能性が示された。

##### (3) 分光学的特性の評価

OI では、700 ~ 900 nm の近赤外領域の光を吸収し、また、その領域の蛍光を発する蛍光色素が有用であると知られている。そこで、化合物 B について、その分光学的特性を測定した。HSA 溶液中において、化合物 B は 797 nm に吸収極大波長を示し、また、吸収極大波長の光で励起したときの蛍光極大波長は 809 nm であった。

以上より、化合物 B の HSA 溶液中における吸収極大波長および蛍光極大波長がいずれも近赤外領域にあり、化合物 B は OI による体内動態の追跡が可能であることが示唆された。

##### (4) 細胞移行性に関する検討

ホウ素含有化合物ががん細胞に移行していると、BNCT でより高い治療効果を得ることができると知られている。そこで、化合物 B のがん細胞移行性について評価をした。化合物 B を含む培地で培養した後の HeLa 細胞は、化合物 B を加えずに培養した HeLa 細胞 (Control) と比べて、蛍光強度が有意に上昇した (図 2)。

以上より、化合物 B は、アルブミンを含む溶液中でがん細胞と培養しても、がん細胞に移行することが示された。

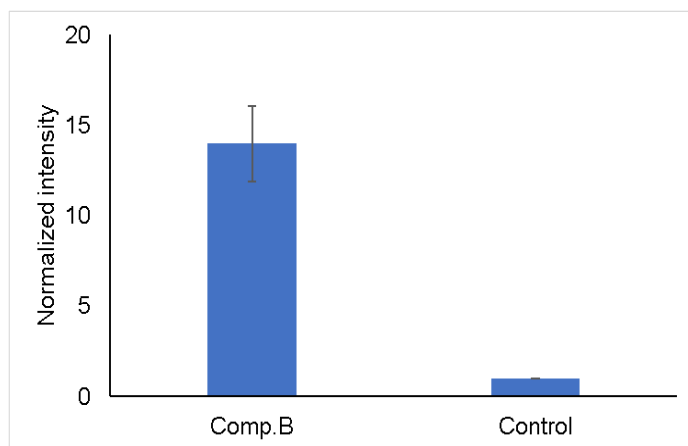


図 2. 化合物 B とインキュベートした HeLa 細胞の蛍光強度

##### (5) 担がんモデルマウスを用いた体内動態評価

化合物 B が体内投与後にがん集積するかを調べるために、担がんモデルマウスに化合物を投与し、蛍光撮像を行った。化合物 B はともに右下肢皮下のがん部位に集積し、蛍光を発した。

以上の結果から、化合物 B は、所期の通り、がん集積性を持つことが示され、ホウ素含有化合物として利用可能であることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

日本薬学会 第 139 年会

(2019 年、3 月、千葉)

菊地正悟、尾江悟、西紗里奈、水野雄貴、宿里充穂、秋澤宏行  
腫瘍の SPECT/蛍光デュアルイメージングを目的とした放射性ヨウ素結合シアニン系色素の  
合成と基礎的評価

第 61 回 日本薬学会関東支部大会

(2018 年、8 月、港区)

紺野龍平、尾江悟、菊地正悟、布施有理、窪田奈々、秋澤宏行  
がん集積性シアニン系色素の放射性標識誘導体化に関する基礎的検討

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

秋澤 宏行 (AKIZAWA, Hiromichi)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90311795

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。