

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：81603

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19671

研究課題名(和文) LAT2阻害薬による正常細胞の選択的防護に基づくBNCT治療効果比の向上

研究課題名(英文) Improvement of BNCT therapeutic gain based on selective protection of normal cells by LAT 2 inhibitor

研究代表者

廣瀬 勝己(Hirose, Katsumi)

一般財団法人脳神経疾患研究所・南東北BNCT研究センター・診療所長

研究者番号：60623767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：LATを特異的に阻害する化合物としてBCH類似の化合物検索の結果選出されたLAT2阻害活性を有する化合物KYT-0284を合成した。腫瘍のL-アミノ酸トランスポーターのサブタイプの発現は、9種類のヒト腫瘍細胞においてはLAT1が有意に発現しており、LAT2阻害の影響は受けにくいと考えられた。KYT-0284は、LAT2阻害活性を優位に示すものの、LAT1阻害活性も同時に示した。KYT-0284は、LAT1とLAT2の両方の活性を阻害する薬剤として、例えば臨床において整容性に大きく影響する広範な脱毛の予防のための皮膚塗布外用剤としての可能性が見出しうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウ素中性子捕捉療法の治療効果はホウ素製剤であるフェニルアラニン誘導体p-L-boronophenylalanine (BPA)の取り込みに大きく依存している。この取り込みに関与する輸送体としてL-アミノ酸トランスポーターが見出されている。LAT1は腫瘍細胞に多く発現する一方、LAT2は正常組織の細胞に多く発現するとされてきた。LATの阻害作用を有するKYT-0284は皮膚への塗布など腫瘍とは離れた部位の局所的なBPA取り込み阻害を目的として使用される上で極めて適した化合物である。現在BNCT後脱毛で整容面で多くの患者が苦しんでおり、KYT-0284は将来BNCT患者にとっての救世主となる。

研究成果の概要(英文)：KYT-0284, a compound with LAT2 inhibitory activity, was synthesized as a specific inhibitor of LAT, which was selected as a result of a search for BCH-like compounds. As a subtype of the tumor L-amino acid transporter, LAT1 was significantly expressed in nine types of human tumor cells and tumor cells were unlikely to be affected by LAT2 inhibition. KYT-0284 could be found as an agent that inhibits the activity of both LAT1 and LAT2, e.g., as a topical skin-applied agent for the prevention of extensive hair loss, which significantly affects its cosmetic appearance in clinical practice.

研究分野：ホウ素中性子捕捉療法

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 LAT

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物学的効果の高い腫瘍細胞選択的な粒子線治療という BNCT の最大のメリットを実現するにはホウ素薬剤が腫瘍細胞選択的に取り込まれることが必要であり、かつ腫瘍細胞内の有効ホウ素濃度 20 - 40 ppm が達成されなければならない。ホウ素薬剤は無毒性で大量投与が可能であることが必要とされる。無毒性の薬剤として実用可能なものは L-BPA (L-boronophenylalanine) および BSH の 2 剤のみで、これまでにかなりの数の薬剤が検討されたが実用に至っていない。近年リポソーム封入法や WOW エマルジョン封入法などの技術により細胞内ホウ素集積性を高める手法を検討する新規 Drug delivery system (DDS) 研究が BNCT 薬剤研究の趨勢となっているが、やはり毒性の問題が解決されず実用化には至っておらず、研究ストリームの大きな転換を迫られている。

研究代表者は腫瘍低酸素細胞および癌幹細胞の放射線抵抗性機序の解明と増感の工夫について基礎的検討を実施してきた経緯から、BNCT の混沌として存在する上記の問題をこれまでと異なるアプローチで切り込むため、正常細胞の L-BPA の取り込みに着目した。唯一の腫瘍細胞指向性薬剤である L-BPA は、アミノ酸誘導体として L-アミノ酸トランスポーター (LAT) を介して細胞に取り込まれる。前述の通り正常細胞には正常型の LAT2 が定常発現しているため、正常細胞にも L-BPA が取り込まれ、これにより BNCT の治療可能比は制限される。そこで正常細胞 LAT2 に起因するこの制限を解除すれば BNCT の治療域の拡大に繋がる。

### 2. 研究の目的

BNCT のメリットである腫瘍細胞選択的治療を実現するには、ホウ素薬剤を腫瘍特異的に取り込ませることが大前提となる。しかし現状のホウ素薬剤では腫瘍選択性が低く正常組織への生物学的影響が不可避である。そこで本研究では、現状用いられているホウ素薬剤 L-BPA (L-boronophenylalanine) を取り込む L-アミノ酸トランスポーター (LAT) に関する腫瘍細胞のホモログ発現プロファイルが正常細胞と異なることに着目し、正常細胞のみを標的とする LAT2 選択的阻害薬を L-BPA に併用することで正常細胞のホウ素取り込みを選択的に阻害し BNCT の治療効果比を向上させ、これにより腫瘍線量の増加や適応疾患の拡大を狙うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) LAT2 阻害剤の合成：

LAT を特異的に阻害する化合物として BCH 類似の化合物検索の結果選出された LAT2 阻害活性を有する化合物 KYT-0284 を合成した。合成には 3-ベンジルオキシベンズアルデヒドを元にした合成スキームを用い、10 段階の反応行程をもとに LAT2 阻害剤 KYT-0284 を合成した。

#### 2) 腫瘍細胞での L-アミノ酸トランスポーターサブタイプの発現状況と LAT2 選択的阻害剤の有用性に対する考察

ヒトの腫瘍細胞株 10 種類より、カラム法を用いて total RNA を抽出し、途中で、ribosomal RNA を分解除去し、mRNA のみを抽出する。抽出された mRNA を磁気ビーズ法をもちいて精製し、mRNA を断片化させた。第 1 鎖より cDNA を合成したのち第 2 鎖を合成した。3'-末端のアデニル化を行いアダプター配列をライゲーションした。PCR を使用してライブラリー内の両末端にアダプター分子のついた DNA 断片を選択的に増幅した。最終産物を Agilent TapeStation で DNA-1000 chip を用いてサンプルのサイズと純度を確認した。それぞれの細胞において上記のサンプル精製を行った後、すべてのライブラリーをプールして、Illumina の NextSeq550 を用いてシーケンシングを行った。シーケンシングによって得られたデータは Illumina の SequencingHub において bam ファイルに変換し、これを Cufflinks を用いて解析し、FPKM 値をもとに、LAT1, LAT2, LAT3, LAT4 それぞれの遺伝子である SLC7A5, SLC7A8, SLC43a1, SLC43a2 の RNA 発現量として評価した。

#### 3) アフリカツメガエルの卵母細胞における KYT-028 の LAT2 阻害作用の検討：

アフリカツメガエルの卵母細胞に LAT1, LAT2, LAT3, LAT4 の遺伝子を強発現させ、KYT-0284 を 0.025, 0.1, 2.5, 5 mM を終濃度として添加したときの<sup>14</sup>C]L-Leu の取り込みを液体シンチレーションカウンターによって定量化し、LAT2 選択性を評価した。

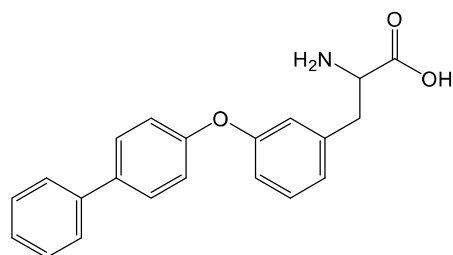
### 4. 研究成果

#### 1) LAT2 阻害剤の合成

LAT2 阻害剤としての可能性が見出された KYT-0284 は、薬剤の多種類の新規化合物合成とハイスループットスクリーニングのもとに LAT2 選択性を有する可能性が見出された化合物であ

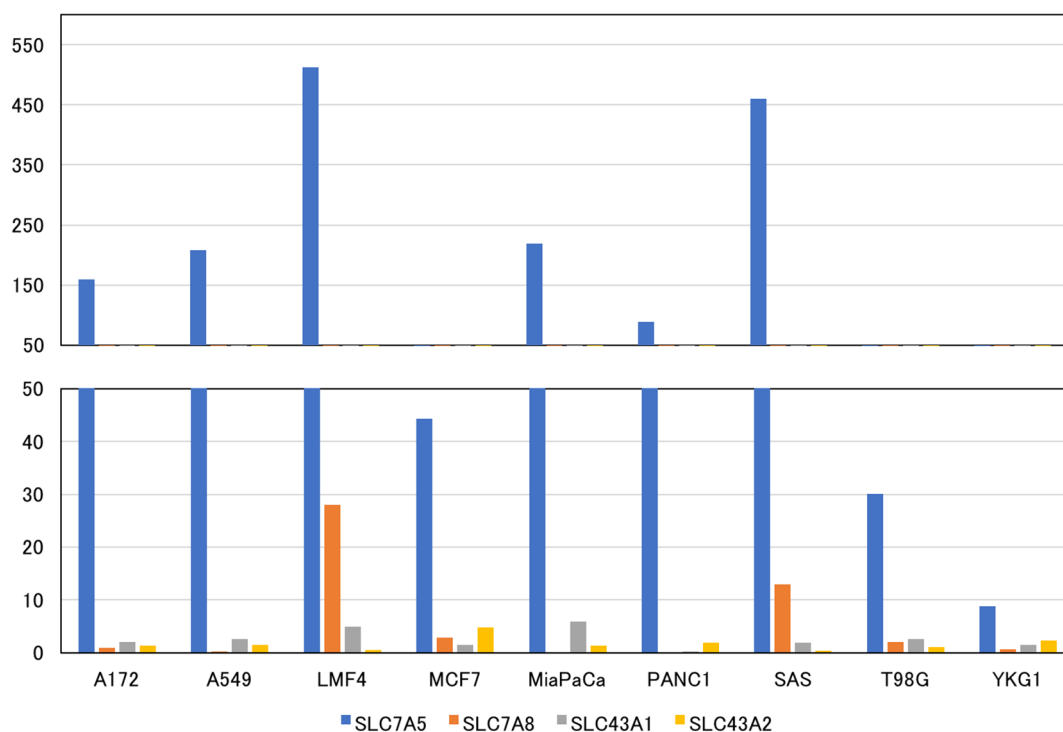
る。そこで、本研究における各種試験実施に足る KYT-0284 を合成するための合成経路の見直しが行われた。KYT-0284 の合成には、2-ベンジルオキシベンズアルデヒドを原料として合成するプロセスを選択した。途中生成するメタチロシンはラセミ体として合成されるため、この光学分割については酵素法を用いて実施する検討を進めた。

酵素法により、酵素の高い不斉識別能を利用し、ラセミ体的一方のみのエナンチオマーを選択的に反応させる方法を平成 29 年度および平成 30 年度の長期に亘り試みたが、十分な光学異性体の濃縮が困難であることが明らかとなった。このため平成 30 年度中途より令和元年にかけての検討はラセミ体を用いた検討が必要であった。



## 2) 腫瘍細胞での L-アミノ酸トランスポーターサブタイプの発現状況と LAT2 選択的阻害剤の有用性に対する考察

平成 30 年度から令和元年にかけて、LAT2 阻害剤 KYT-028 の光学異性分割が思わしくなかったため、平行して腫瘍細胞における L-アミノ酸トランスポーターサブタイプの RNA 発現状況を RNA-Seq を用いて評価した。9 種類のヒト由来腫瘍細胞株のいずれにおいても LAT1 が最も多く発現していることが明らかになった。ただし、LAT1 が多く発現する腫瘍細胞では LAT2 も比較的によく発現する傾向が認められた。LAT3 および LAT4 はいずれの細胞においても発現は乏しかった。以上のことから、腫瘍細胞の主たるアミノ酸取り込みは LAT1 の寄与が多く、LAT2 の選択的な阻害は、腫瘍細胞のアミノ酸取り込みをほとんど阻害しないことが示唆された。つまり LAT2 の選択的阻害によって正常細胞へのホウ素製剤 BPA の取り込みを阻害するときも腫瘍細胞への BPA 取り込みがほとんど阻害されない可能性が高いことが示唆された。



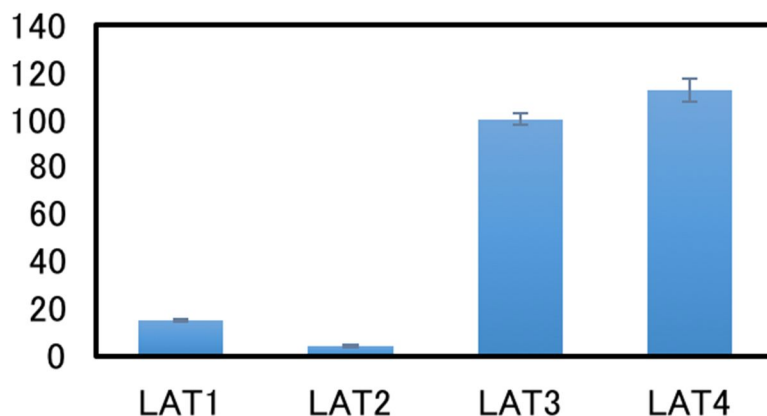
## 3) アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた KYT-0284 の LAT2 選択性の評価

アフリカツメガエルの卵母細胞は膜タンパク質発現性が高く、手間のかかる準備が不要のため、イオンチャネルやトランスポーターに対する創薬探索に有用であると考えられている。そこで上記で合成された KYT-0284 ラセミ体を用いて、平成 30 年度よりアフリカツメガエルの卵母細胞に強発現させた LAT のサブタイプに対する KYT-0284 の選択的阻害作用を検討した。KYT-0284 は 0.1 mM と比較的低濃度で LAT2 強発現卵母細胞の<sup>14</sup>C]L-Leu 取り込みを 4.16±0.362% まで減少させた (p<0.001)。

ただし一方で、LAT1 強発現卵母細胞についても<sup>14</sup>C]L-Leu 取り込みを 15.01±0.54% まで減少させ (p<0.001) LAT1 阻害作用も併せ持つことが明らかとなった。LAT3 強発現卵母細胞および

LAT4 強発現卵母細胞でのそれぞれの $[^{14}\text{C}]$ L-Leu 取り込みは、2.5 mM の KYT-0284 の存在下でも、それぞれ  $100.1 \pm 2.5\%$  ( $p=0.99$ ),  $112.6 \pm 4.9\%$  ( $p=0.12$ ) とまったく阻害されなかった。以上より、LAT2 特異的阻害作用を有すると考えられた KYT-0284 は、LAT1 と LAT2 の選択的阻害作用は有するが、LAT1 と LAT2 を区別することは困難である可能性が示唆された。

Fig. KYT-0284ラセミ体の  
 $[^{14}\text{C}]$ L-Leu取り込み阻害能



#### まとめ

LAT を特異的に阻害する化合物として BCH 類似の化合物検索の結果選出された LAT2 阻害活性を有する化合物 KYT-0284 を合成した。合成スキームの検討に長期を要するも光学異性体の分離は困難であった。腫瘍の L-アミノ酸トランスポーターのサブタイプの発現は、9 種類のヒト腫瘍細胞においては LAT1 が有意に発現しており、LAT2 阻害の影響は受けにくいと考えられた。アフリカツメガエルの卵母細胞に LAT1 サブタイプをそれぞれ別個に発現させたところ、KYT-0284 は、LAT2 阻害活性を優位に示すものの、LAT1 阻害活性も同時に示してしまうことが明らかになった。LAT1 と LAT2 の特異性を示せなかったため、正常組織の LAT2 阻害により BNCT の有害事象を軽減することを目的とした使用では、腫瘍のホウ素製剤 BPA の取り込みをも少なからず阻害してしまい、BNCT の治療効果の減弱をもたらしまうものと考えられた。逆に、KYT-0284 は、LAT1 と LAT2 の両方の活性を阻害する薬剤として、例えば臨床において整容性に大きく影響する広範な脱毛の予防のための皮膚塗布外用剤としての可能性を見出さうと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	佐藤 まり子  (Sato Mariko)  (30645263)	弘前大学・医学部附属病院・助教   (11101)	
研究分担者	安西 尚彦  (Anzai Naohiko)  (70276054)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	
研究分担者	高井 良尋  (Takai Yoshihiro)  (50107653)	一般財団法人脳神経疾患研究所・南東北BNCT研究センター・センター長   (81603)	