

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03352

研究課題名(和文) グルタミン中毒がんの特異的なアミノ酸輸送系を利用する新規ホウ素キャリアの開発

研究課題名(英文) Development of novel boron carrier utilizing amino acid transporters specific for glutamine addiction of cancer cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞選択的に効率よく $^{10}\text{B}$ 原子を集積させるホウ素キャリアの開発を目指して、「グルタミン中毒」というがんの特徴に着目し、グルタミン依存性の高い悪性腫瘍細胞に強発現するL型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1)を標的とする新規カルボラン含有アミノ酸誘導体を設計・合成した。細胞内ホウ素取り込みを指標とするスクリーニングによって選別されたBC2は、用量依存的な取り込みを示し、同一投与量(10  $\mu\text{gB/mL}$ )で比較したところ、既存のLAT1依存的ホウ素キャリアであるL-BPAの10倍以上高い取り込み量を示した。中性子照射における細胞毒性はBC-2存在下で著しく増強されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、小型加速器が実用化され、ホウ素中性子捕捉療法に注目が集まっている。本研究では、現在臨床適用されるL-BPAを大きく上回る腫瘍取り込みとホウ素中性子捕捉効果を示す有望な新規ホウ素キャリアを開発した。本化合物は、簡便に合成でき、難治性腫瘍に強発現しているLAT-1を介して取り込まれることを明らかにした。本化合物の臨床適用が実現すれば、がん選択的治療法として有望なホウ素中性子捕捉療法の実用化を加速し、転移性がん、難治性がん治療に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a boron carrier for BNCT that selectively and efficiently accumulates  $^{10}\text{B}$  atoms in tumor cells. Therefore, focusing on "glutamine addiction" caused by metabolic reprogramming of tumors, we designed and synthesized a novel carborane-containing amino acid derivatives targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1), which is strongly expressed in malignant tumor cells. Among the new compounds, BC2 gave the highest intracellular boron uptake. This was dose-dependent, with 10-fold higher uptake than the known LAT1-dependent boron carrier, L-BPA, at the same dose (10  $\mu\text{gB/mL}$ ). BC-2 showed the highest enhancement of the cell killing effect of thermal neutrons on T98G cells.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：グルタミン中毒 ホウ素中性子捕捉療法 L型アミノ酸トランスポーター がん治療

### 1. 研究開始当初の背景

**BNCT** について: **BNCT** は、**1968** 年に世界に先駆けて日本ではじめてがん治療に用いられた画期的な放射線治療法であり、唯一の原爆被災国である我が国でこのような核分裂の有効利用法を確立することは大変重要な意義を持つと考えられる。<sup>10</sup>B 原子をがん選択的に集積させるホウ素キャリアができれば、正常細胞等に傷害をあたえず、腫瘍細胞のみを選択的に破壊できる理想的ながん治療法となる。現在臨床研究に用いられるホウ素キャリアは **sodium borocaptate (BSH)** 及び **L-p-boronophenylalanine (L-BPA)** の 2 種類のみであるが、これらの腫瘍への集積は十分とは言えず、中でも治療抵抗性の低酸素細胞への取り込みが悪く、**BNCT** の優位性が発揮できない。一方、**2012** 年以降、加速器で発生させた中性子を **BNCT** に使用するプロジェクトが開始され、病院設置型の **BNCT** システムによる前臨床試験が全国的に展開され、一気にその実用性が高まっている。そこで臨床適用可能な優れたホウ素キャリアの開発が一層強く求められている。

グルタミン中毒とアミノ酸トランスポーターについて: がん細胞の好氣的解糖(ワールブルク効果)は古くから知られる現象で、グルコーストランスポーター (**GLUT1**) はがん治療標的のひとつである。近年、がんの増悪に伴い、アミノ酸代謝のリプログラミングが起きてグルタミン依存性が高まることが明らかになった。(L. Yang et al., Mol Syst Biol. 2014, 10, 728) がん細胞はその旺盛な増殖のために、好氣的解糖に強く依存している。さらに悪性度の高い癌細胞の多くは、グルタミンがグルコースから合成され得る非必須アミノ酸であるにもかかわらず、グルタミンに対する高い依存性を示す。この現象は、グルタミン中毒と呼ばれ、がん克服のための新しい治療標的として注目を集めている。(E.R. Still et al., Br J Cancer 2017, 116, 1375) そのため、がん細胞では種々の栄養トランスポーターの発現が亢進している。糖のトランスポーターは正常細胞でもがん細胞でも同じ **GLUT1** が用いられるが、アミノ酸トランスポーターにはがん細胞特異的な分子 (**ASCT2**, **LAT1**, **xCT** など) が存在し、診断マーカーや治療標的として注目されている。さらに興味深いことに、がん組織では隣接する正常組織に比べて、グルコースはむしろ減少しているのに対して、アミノ酸量は二倍程度に増加していることから、腫瘍選択的な蓄積を目的とする場合は、アミノ酸トランスポーターを標的とすることが効率的だと考えられる。特に、グルタミン中毒を呈するがん細胞には、大量のグルタミンを取りこむ **ASCT2** とそれに共役して中性必須アミノ酸を取りこむ **LAT1** が強発現していることから、これらの輸送基質の構造に着目した。

### 2. 研究の目的

**BNCT** を一般治療として実現するため、臨床適用可能で、実用性の高いホウ素キャリアとして、腫瘍に強発現するアミノ酸トランスポーターによって腫瘍選択的に集積するホウ素クラスター型輸送基質を開発する。本研究を通して、1) グルタミン中毒を呈する腫瘍細胞に特異的に発現するアミノ酸トランスポーター (**ASCT2**, **LAT1**) の腫瘍選択的送達の標的としての有用性を明らかにする、2) **ASCT2** 及び **LAT1** の輸送基質ミミック設計における疎水性ファーマコフォアとしてのホウ素クラスターの意義と構造活性相関の解明、3) 当該分子の実用的合成法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法と研究成果

#### 分子設計と合成

医薬品分子設計において炭素多環式スカフォールドは膜透過性の改善、**BBB** 透過や中枢神経系への送達のために、疎水性を付与する置換基として利用される。一方、多面体ホウ素クラスターは安定で、骨格の  $\sigma$  結合電子が 3 次元的に非局在化している(擬芳香族性)ことから、ドラッグデザインにおいて多環炭化水素または芳香環の等価体として用いられてきた。(F. Issa et al., Chem Rev 2011, 111, 5701) そこで、**LAT1** 阻害剤の **BCH** の構造から **carborane** を疎水性ファーマコフォアとして導入することを着想し、**LAT1** 及び **ASCT2** の阻害

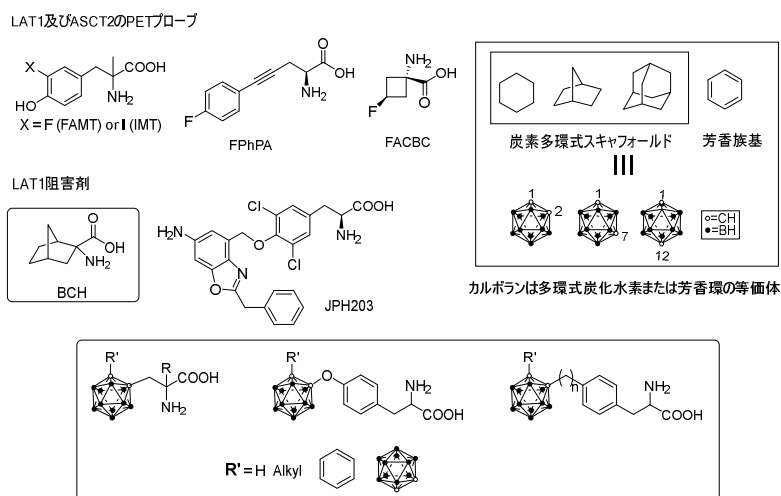


Fig. 1 アミノ酸トランスポーター-LAT1及びASCT2を標的とするホウ素キャリアの分子設計

carborane を疎水性ファーマコフォアとして導入することを着想し、**LAT1** 及び **ASCT2** の阻害

剤、PETプローブ、BBB透過性プロドラッグ等の構造を基に輸送基質ミミックを設計した。(Fig.1)

対応するアミノ酸アルキン誘導体を合成し、デカボランとルイス塩基存在下、マイクロ波アシスト反応に付したところ、カルボラン含有アミノ酸誘導体を短時間で効率よく得ることができた(Fig.2)(S. Kimura *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 1721)

#### 各ホウ素キャリアの機能評価

逆相高性能薄層クロマトグラフ法を用いて、合成したカルボラン含有アミノ酸誘導体、化合物BC-1, 2, 3及び4の疎水性パラメーターであるR<sub>m</sub>値の測定を行った。LAT1輸送基質であるL-BPA、フェニルアラニン、チロシンを比較化合物としてこれらのR<sub>m</sub>値も同時に測定した。固定相をn-オクチルシリル化シリカ(60 RP-8 F254S)、移動相をMeOH/20mMリン酸緩衝液(pH7.2) = 7/3として用いて薄層クロマトグラフを行い、各化合物のR<sub>f</sub>値を測定した。(n=3)その後以下の計算式(a)を用いてR<sub>m</sub>値を求めた。

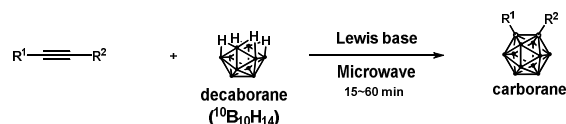
$$R_m = \log(1/R_f - 1) \quad (a)$$

R<sub>m</sub>値の値より疎水性は、BC-4 > BC-2 > BC-3 >> BC-1 >> Phe > L-BPA > Tyrの順に高かった。

各ホウ素キャリアの細胞内取り込み実験を行うにあたり、MTTアッセイを用いて細胞毒性の有無を調べた。細胞はLAT1を発現している神経膠芽腫細胞T98Gを用いた。0, 2, 5, 10 µg <sup>10</sup>B/mLのL-BPA, BC-1, 2及び3をT98G細胞に投与し、20時間処理した後の生存率を比較した。いずれの化合物も10 µg <sup>10</sup>B/mLの濃度まで生存率は約80%以上を示した。

次に、各ホウ素キャリアの細胞内ホウ素取り込みを調べた。T98G細胞に10 µg <sup>10</sup>B/mLのL-BPA, BC-1, 2及び3を投与し、20時間処理した。その後トリプシン処理によって採取した細胞を濃硝酸にて溶解したサンプルのホウ素量をICP-AESを用いて測定した。細胞内ホウ素取り込み量はBC-2 > BC-1 > L-BPA > BC-3の順に高く、4つのうちBC-2が最も高いホウ素取り込みを示した。(Fig.3)についてBC-2(10 µg <sup>10</sup>B/mL)を用いて、処理時間のよる取り込み料の変化を調べたところ、取り込み時間2時間までホウ素量は上昇して上限に達し、それ以上では20時間処理まで一定の取り込み量であった。そこで2時間の処理で投与量を増やしたところ、BPAと比較し、BC-2は有意に多く取り込まれ、化合物処理濃度を二倍にすると、細胞内取り込み量も二倍以上に増加した。(Fig.4)

以上の取り込み実験において、アミノ酸トランスポーターを介して取り込まれていれば、トリプシン処理による細胞採取の間にホウ素化合物が排泄される可能性が考えられたことから、ホウ素化合物の処理時間を15分とし、冷PBSで洗浄の後、直ちに濃硝酸にて溶解することとして、ホウ素量を調べた。結果、トリプシン処理を経る場合に比べて、ホウ素取り込み量はL-BPAで約4倍、BC-2で約8倍高い値となった。このことから、これらのホウ素化合物は、交換輸送型トランスポーターによって取り込まれている可能性が示唆された。そこで、LAT-1遺伝子修飾細胞(マウス扁平上皮癌野生型SCCVII-WT及び欠損細胞SCC7-ΔLAT1)を用いて上記のトリプシン処理を経ない方法でホウ素取り込み量の評



S. Kimura *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 1721.

|      | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> |
|------|----------------|----------------|
| BC-1 | H              |                |
| BC-2 | H              |                |
| BC-3 | Ph             |                |
| BC-4 | H              |                |

Fig. 2 Structures of new boron carriers synthesized from corresponding alkynes and decaborane by micro-wave assisted reaction.

Table 1. LAT1輸送基質及び合成したホウ素キャリアのR<sub>m</sub>値

| compound | R <sub>f</sub> | R <sub>m</sub> |
|----------|----------------|----------------|
| phe      | 0.75           | -1/10          |
| tyr      | 0.85           | -1.77          |
| L-BPA    | 0.80           | -1.39          |
| BC-1     | 0.48           | 0.08           |
| BC-2     | 0.30           | 0.85           |
| BC-3     | 0.32           | 0.77           |
| BC-4     | 0.25           | 1.08           |

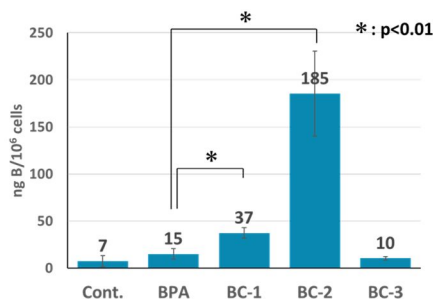


Fig. 3 L-BPA及びBC-1, 2及び3の処理におけるT98G細胞の細胞内ホウ素濃度

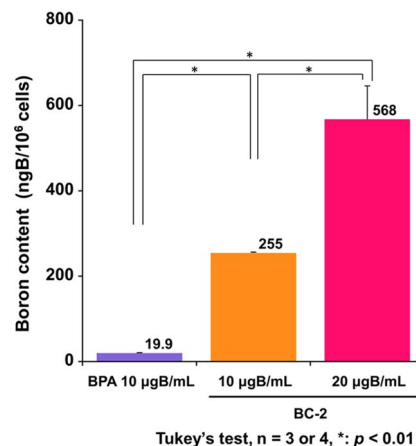


Fig. 4 T98G細胞におけるL-BPA及びBC-2の投与量と細胞内ホウ素濃度

価を行ったところ、**L-BPA** 及び **BC-2** いずれも、**15** 分処理において、**LAT-1** 欠損細胞の場合、有意に取り込み量が減少した。以上により、**BC-2** は **LAT-1** を介して取り込まれていることが示唆された。しかしながら、**BC-2** の場合、上記のようにトリプシン処理細胞においても、**L-BPA** と異なり、高い細胞内ホウ素量を維持しており、処理時間を伸ばすと取り込みが増加したことなどから、**LAT-1** 経路以外の何らかの異なる機構で取り込まれていることが示唆された。

次に、ホウ素化合物の中性子補足による抗腫瘍効果を評価するため、**T98G** 細胞を  $10\mu\text{g }^{10}\text{B/mL}$  の **L-BPA** または各種カルボラン誘導体で **20** 時間処理した後、細胞を **PBS** で洗浄し、血清含有培地に懸濁してテフロンチューブに分注し、京都大学原子炉実験所 (**KUR**) の重水施設 (出力 **1MW**) で中性子ビームを照射し、コロニーアッセイを行って生存曲線を求めた。(Fig. 5A) 各種カルボラン含有アミノ酸類縁体のうち、**BC-2** が最も強い抗腫瘍効果を示した。そこで、**L-BPA** ( $10\mu\text{g }^{10}\text{B/mL}$ ) または **BC-2** ( $10$  or  $20\mu\text{g }^{10}\text{B/mL}$ ) 存在下で、**T98G** 細胞を **2** 時間培養した後、同様に中性子を照射して生存曲線を求めたところ、**BC-2** は **20** 時間処理した場合よりも強い増殖阻害効果を示した。( Fig. 5B )

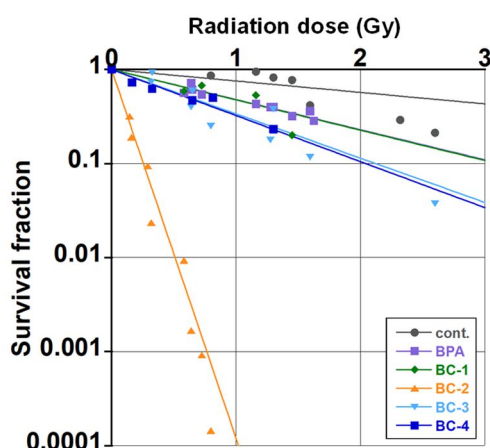


Fig. 5A 各種ホウ素キャリア存在下の中性子照射によるT98G細胞の生存曲線

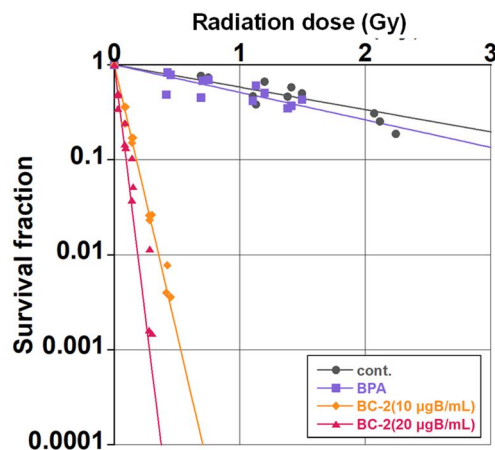


Fig. 5B BPAまたはBC-2存在下の中性子照射によるT98G細胞の生存曲線

以上の生存曲線から、**10%**生存率となる中性子照射量 ( $D_{10}$ ) 及び、ホウ素キャリアを投与しない場合に対する増感率 (**ER**) を求めた。( Table 2 ) **BC-2** は **2** 時間の処理で、**L-BPA** の **10** 倍以上の細胞内ホウ素濃度を示し、それは用量依存的に増加した。また、非常に高い中性子捕捉効果による生存阻害作用を示し、新たなホウ素キャリアの有力候補であることが示唆された。今後、**BC-2** の細胞内への取り込み機構や生体内分布の解明、*in vivo* 評価を行う予定である。

Table 2. 各種ホウ素キャリアによる細胞内ホウ素取り込みと中性子捕捉効果

| 処理条件                                    | cellular uptake of B<br>(ngB/ $10^6$ cells) | D10<br>(Gy) | ER    |
|---|---|-------------|-------|
| <b>BPA</b> 10 $\mu\text{gB/mL}$ , 2 h   | 20  | 3.43        | 1.13  |
| <b>BC-1</b> 10 $\mu\text{gB/mL}$ , 20 h | 37 $\pm$ 6                                  | 2.72        | 2.12  |
| 10 $\mu\text{gB/mL}$ , 2 h              | 252 $\pm$ 3                                 | 0.19        | 20.98 |
| <b>BC-2</b> 10 $\mu\text{gB/mL}$ , 20 h | 185 $\pm$ 15                                | 0.23        | 24.82 |
| 20 $\mu\text{gB/mL}$ , 2 h              | 529 $\pm$ 64                                | 0.11        | 34.28 |
| <b>BC-3</b> 10 $\mu\text{gB/mL}$ , 20 h | 11 $\pm$ 1                                  | 1.87        | 3.07  |
| <b>BC-4</b> 10 $\mu\text{gB/mL}$ , 20 h | 21  | 2.12        | 2.72  |

D10 : dose giving a survival of 10%, ER : Enhancement ratio = D10 cont. / D10 drug

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sakai Takayuki, Matsuo Yoshiyuki, Okuda Kensuke, Hirota Kiichi, Tsuji Mieko, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko       | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Development of antitumor biguanides targeting energy metabolism and stress responses in the tumor microenvironment | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>4852 1-15 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-021-83708-w   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松下 明香里、辻 美恵子、真田 裕生、平山 祐、増永 慎一郎、永澤 秀子 |
| 2. 発表標題<br>アミノ酸トランスポーターを標的とする新規ホウ素キャリアの開発       |
| 3. 学会等名<br>京大複合研第55回学術講演会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松下 明香里、平山 祐、増永 慎一郎、永澤 秀子  |
| 2. 発表標題<br>Development of novel bicyclic octadepsipeptids with potent antitumor and antiangiogenic and HIF-1 inhibitory activities |
| 3. 学会等名<br>第79回日本癌学会学術総会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松下 明香里、辻 美恵子、平山 祐、永澤 秀子               |
| 2. 発表標題<br>中性子捕捉療法のための10B - ホウ素クラスター含有アミノ酸誘導体の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会大141年会                           |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松下 明香里、辻 美恵子、平山 祐、永澤 秀子                      |
| 2. 発表標題<br>腫瘍で高発現するトランスポーターを標的とする中性子捕捉療法のための ホウ素キャリアの開発 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第140年会                                  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>新津 明穂、辻 美恵子、真田 悠生、平山 祐、増永 慎一郎、永澤 秀子         |
| 2. 発表標題<br>ホウ素中性子補足療法のためのLAT1輸送基質を模した10Bクラスター含有アミノ酸の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本がん分子標的治療学会学術集会                            |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>永澤 秀子   |
| 2. 発表標題<br>Development of carborane-containing amino acid derivatives for boron neutron capture therapy (BNCT) |
| 3. 学会等名<br>日台BNCT研究会（招待講演）（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>新津 明穂、山本 凌太、真田 悠生、渡邊 翼、辻 美恵子、平山 祐、増永 慎一郎、永澤 秀子 |
| 2. 発表標題<br>腫瘍特異的なアミノ酸輸送系を利用する中性子捕捉療法のための新規ホウ素キャリアの開発      |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会143年会                                     |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>永澤 秀子、新津 明穂、真田 悠生、辻 美恵子、平山 祐、増永 慎一郎    |
| 2. 発表標題<br>ホウ素中性子捕捉療法のためのLAT-1輸送基質を模倣したホウ素キャリアの開発 |
| 3. 学会等名<br>第59回生物部会学術大会・第50回放射線による制癌シンポジウム（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2022年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 平山 祐<br><br>(Hirayama Tasuku)<br><br>(10600207) | 岐阜薬科大学・薬学部・准教授<br><br><br>(23701) |    |
| 研究分担者 | 辻 美恵子<br><br>(Mieko Tsuji)<br><br>(40709721)    | 岐阜薬科大学・薬学部・助教<br><br><br>(23701)  |    |

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 |
|---------|---------|