

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05735

研究課題名(和文)腫瘍部位におけるホウ素濃度の計測を可能とするBNCT用薬剤の創出

研究課題名(英文)Creation of new agents for BNCT that enable to measure boron concentration at tumor site

研究代表者

加来田 博貴 (Kakuta, Hiroki)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：80362961

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)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、 $^{10}\text{B}$ と中性子の衝突に依存するため、がん組織中のホウ素濃度が重要なファクターとなる。しかし、がん組織中のホウ素濃度が測定可能な薬剤はない。本研究は、当該課題を解決するBNCT用薬剤の創出を目指した。X線CTにおけるヨウ素濃度定量性に着目し、ジヨードベンゼンとホウ素クラスターであるBSHを有する化合物を設計した。中でもフルオロエチル基を有するBS-DIP-OEF(3c)が、800 ppm以上のヨウ素濃度であればX線CTで定量性を認めること、また3c処置の細胞に中性子線照射したところ、細胞内ホウ素濃度とホウ素中性子捕捉反応(BNCR)の高い相関性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出したBS-DIP-OEF(3c)は、X線CTによるがん組織造影とBNCT治療という2面性を有し、治療(therapeutics)と診断(diagnostics)を一体化したアプローチである「theranostics」に資する化合物とも言える。また3cは、BNCT用薬剤として唯一承認されているボロファランと異なり、アミノ酸誘導体ではない。ボロファランのがん細胞への取り込みがアミノ酸輸送体であるLAT1を介して行われるとされるため、LAT1発現の少ないがん組織ではボロファランは無効とされる。そのため、ボロファランが不得手とするがん組織での3cの有効性も期待される。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) depends on the collision of  $^{10}\text{B}$  and neutrons, so the concentration of boron in the cancer tissue is an important factor. However, there is no boron compounds whose boron concentration in cancer tissue can be measured. In this study, we aimed to create new compounds for BNCT to solve this problem. Focusing on the quantification of iodine concentration in X-ray CT, we designed compounds having diiodobenzene and BSH, which is a boron cluster. Among them, BS-DIP-OEF (3c), which has a fluoroethyl group, showed quantifiability in X-ray CT at iodine concentrations above 800 ppm. When neutron beam irradiation is performed on the cells treated with 3c, the boron neutron capture reaction (BNCR) were highly correlated with intracellular boron concentration.

研究分野：医薬化学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 BNCT 非侵襲的濃度測定 X線CT 分子設計 BSH 中性子線照射 CR-39

## 1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、特に、がん細胞と正常細胞が混在している悪性度の高い脳腫瘍やメラノーマの治療に効果的であり、治療後の QOL も優れていることから近年注目を浴びている。しかし、上市されている BNCT 用ホウ素薬剤はボロファラン (1a)のみであり、臨床研究用のホウ素薬剤としてもホウ酸、BSH (2) (図1) に限られる。

BNCT 用薬剤は、熱中性子線と  $^{10}\text{B}$  の反応確率を上げるために、以下の4点を満たすことが要求されている (文献1)。

- 1) がん細胞に選択的 (がん組織/正常組織比(T/N)比 >3 以上)、且つ、多量 ( $^{10}\text{B}$ -ホウ素 濃度 20~40 ppm) に集積すること
- 2) それ自身は薬効を持たず、ホウ素送達分子としての機能のみを有すること
- 3) 代謝を受けることなく、一定時間ががん組織に滞留すること
- 4) 血中に直接投与するため低毒性であること

ボロファラン (1a)は上記4条件を満たすとされるが、点滴にて 500 mg/kg と大量投与される。

BNCT では、腫瘍部位への中性子線照射量の設定を行うために、個々の患者に対して腫瘍部位におけるホウ素薬剤の集積量を求めなければならない。

しかし、ボロファラン (1a)では、腫瘍部位における集積量を直接求めることはできない。そのため、ボロファラン (1a)の腫瘍集積量は、ボロファラン (1a)に陽電子放射断層撮影 (PET) を可能とする  $^{18}\text{F}$  を導入した [ $^{18}\text{F}$ ]F-BPA (1b) (図1) によって見積もられている。しかし[ $^{18}\text{F}$ ]F-BPA (1b)はボロファラン (1a)とは同一分子でないこと、またその利用には診断から治療までの時間も要し、患者負担が大きい。また、[ $^{18}\text{F}$ ]F-BPA (1b)は放射能を有する  $^{18}\text{F}$  によって標識されているため、患者以上に医療従事者の被曝が問題となっている。

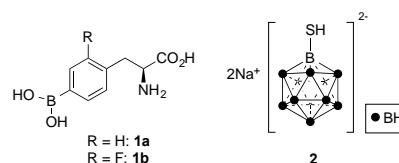


図1. ボロファラン (1a)、F-BPA (1b)ならびに BSH (2)の分子構造。

## 2. 研究の目的

本研究は、上述した課題の解決に向け、がん組織内のホウ素濃度を直接測定可能な新たな BNCT 用ホウ素送達剤の創出を目的に実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子設計・合成

BNCT 用薬剤が大量投与されることに鑑み、本研究実施者は、BNCT 用薬剤と同様に大量投与される X 線 CT 用ヨード造影剤に着目した。X 線 CT 用ヨード造影剤は、非侵襲的に X 線 CT によってヨウ素濃度が定量できる。本研究実施者はこの原理を利用することで組織中のホウ素濃度測定が可能ではないかと考え、本仮説をもとに、3a-c (図2) をデザイン、合成した。

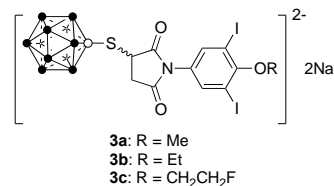


図2. 3a-c の構造式。●は BH, ○は B を表す。

### (2) 化合物の評価

#### ① 被験化合物の細胞内移行性・細胞増殖抑制能評価

被験化合物の細胞内移行性には、マウスメラノーマ由来細胞株 B16/BL6 細胞を用いた。その理由の一つは、当該細胞を用いることで担がんマウスモデルを作成できると判断したためである。当該細胞を 48 時間培養した後、2 もしくは 3a-c を最終濃度 500  $\mu\text{M}$  で 2 時間暴露し、培地除去後 PBS で洗浄した後、細胞を一定量の PBS にて回収した。その後 RIPA lysis buffer で溶解したサンプルをシリジフィルターで濾過し、このサンプルについて LC-MS/MS にて各化合物濃度を測定することで、細胞中ホウ素重量およびヨウ素重量を求めた。また、化合物そのものによる細胞増殖能について、2 時間の化合物暴露後、培地交換を施し 16 時間後、WST-8 試薬を用いて調べた。

#### ② X 線 CT

ヨウ素濃度 4000, 2000, 1000, 500 ppm の水溶液を作成し、PET/CT システムである Eminence STARGATE を用いて X 線 CT 値を測定した。なお、陽性対象物として非イオン性ヨウ素造影剤であるイオパミドールを用いた。

### ③ 中性子線照射実験

ホウ素中性子補足反応 (BNCR) の検出法として、プラスチック固体飛跡検出器 CR-39 の利用が報告されている (文献 2)。本実験では、以下のように CR-39 上に細胞を播種し行なった; 2 cm 四方の CR-39 を沈めた 35 mm シャーレにて細胞培養し、被験化合物入りの培地に交換し 2 時間暴露させた。当該 CR-39 に対し中性子線照射した。中性子線照射は、KUR にて、E-3、2 時間、1 MW、10、20 分もしくは 5 MW、10、20 分で行った。被験化合物の種類は以下の 4 通りである; blank、**2** (500  $\mu$ M)、**3c** (500  $\mu$ M)、**3c** (500  $\mu$ M)+A6K (100  $\mu$ M)。中性子線照射後、文献 2 に従い処理し、顕微鏡 (BZ-X700)にて撮像を行なった。得られた画像を imageJ によって解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 合成

4-Nitrophenol (**4**)を出発原料に、亜塩素酸ナトリウム存在下、ヨウ化ナトリウムと反応させることによりジヨード体 **5**を得た。続いて、**5**のニトロ基を還元しアミノ **6**とした後、各種ヨウ化アルキルを用いてアルコキシ体 **7a-c**を高収率で得た。得られたアルコキシ体 **7a-c**を無水マレイン酸と酢酸ナトリウムによりマレイミド構造を導入し **8a-c**とした。最後に、これらに対し **2**をマイケル付加させることで目的化合物 **3a-c**を得た。

### (2) 化合物の評価

#### ① 被験化合物の細胞内移行性・細胞増殖抑制能評価

細胞  $10^6$  個あたりのホウ素重量は、**2**が 14 ng であったのに対し、**3a**が 110 ng、**3b**が 74 ng、**3c**が 280 ng であった。細胞 1 つあたりの質量を 2.5 ng とした場合 (文献 3 記載の B16/BL6 細胞の平均直径 16  $\mu$ m との情報に基づき、細胞を球体として体積を 2.2 pL と求め、密度 1.0 g/mL をもとに計算)、**3c**のホウ素濃度は 110 ppm に相当した。**3c**のヨウ素濃度は 240 ppm であり、蛍光 X 線 CT であれば検出可能であるが、一般的な X 線 CT においては低濃度であった。

**2**の細胞導入を促進する方法としてオリゴペプチドである N-Ac-A6-K-NH<sub>2</sub> (A6K, **9**)の併用が報告された (文献 4)。500  $\mu$ M の **3c**と 100  $\mu$ M の **9**を混合し細胞に曝露したところ、細胞  $10^6$  個あたりのホウ素濃度は 1,400 ng (550 ppm)、ヨウ素濃度は 3,000 ng (1,200 ppm) であった。

毒性学的な観点から、500  $\mu$ M の **3c**と 100  $\mu$ M の A6K (**9**)の併用における細胞増殖抑制能を調べた結果、薬物未処置群との有意差は認められなかった。

#### ② X 線 CT

**3c**の水溶液を用いて X 線 CT 撮像を施し、**3c**のヨウ素濃度と CT 値の相関を調べた結果、高い相関性が得られ、ヨウ素濃度が 800 ppm 以上であれば定量性が認められることが判明した。

#### ③ 中性子線照射実験

BNCR が定量できるプラスチック固体飛跡検出器 CR-39 上に播種した B16BL6 細胞に **3c**もしくは **3c**と A6K (**9**)の混合液を処置し、当該 CR-39 に対し中性子線照射を行なった (熱中性子フルエンス  $2.22 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$ )。照射後の CR-39 上で生じた BNCR についてエッチピットとして定量した。その結果、LC-MS/MS で算出した細胞内ホウ素濃度との高い相関性が認められた ( $R^2 = 0.968$ , 図 3)。

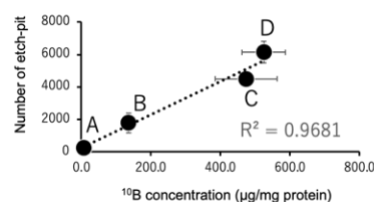


図 3. 細胞内ホウ素濃度と CR-39 上で生じた BNCR との相関。

本研究で創出した **3c**は、A6K ペプチド (**9**)との併用により X 線 CT 撮像による濃度測定が期待できる B16BL6 細胞移行性が認められた。また **3c**は、細胞内にて BNCR を示すことが CR-39 を用いた評価により明らかとなった。**3c**は、がん組織内のホウ素濃度を直接測定可能な新たな BNCT 用ホウ素送達剤として期待できる化合物である。

### <引用文献>

① 日本中性子捕捉療法学会 web サイト ([http://www.jsnct.jp/about\\_nct/houso.html](http://www.jsnct.jp/about_nct/houso.html))

② *Radiat. Res.*, **2019**, *191*, 460–465.

③ *Neoplasia*, **2020**, *22*, 441–446.

④ *J. Control Release*, **2021**, *330*, 788–796.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野崎 瑠威、王 一非、加藤 いずみ、藤原 美智子、渡邊 将貴、櫻井 良憲、加来田 博貴
2. 発表標題 がん組織中ホウ素濃度の直接定量を可能とするBNCT用ホウ素送達剤の創出研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野崎 瑠威、王 一非、加藤 いずみ、藤原 美智子、渡邊 将貴、櫻井 良憲、加来田 博貴
2. 発表標題 がん組織における直接的ホウ素濃度測定を志向したBNCT用薬剤の創出研究
3. 学会等名 第63回 日本生化学会 中国・四国支部例会（徳島）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ホウ素とヨウ素を含有する化合物又はその塩並びにそれらの用途	発明者 加来田博貴	権利者 岡山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-113693	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	濱野 毅  (Hamano Tsuyoshi)  (00425662)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高度被ばく医療センター 放射線緊急事態対応部・部長（定常）   (82502)	
研究分担者	小川原 亮  (Ogawara Ryo)  (00807729)	京都大学・化学研究所・助教   (14301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	佐々木 崇了  (Sasaki Takanori)  (10461253)	岡山大学・学術研究院 医歯薬学域・助教    (15301)	
研究 分担者	井川 和代  (Igawa Kazuyo)  (90512111)	岡山大学・中性子医療研究センター・准教授    (15301)	

	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 協力者	王 一非  (Wang Yifei)	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生    (15301)	
研究 協力者	加藤 いずみ  (Kato Izumi)	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・非常勤研究員    (15301)	
研究 協力者	藤原 美智子  (Fujihara Michiko)	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・非常勤研究員    (15301)	
研究 協力者	渡邊 将貴  (Watanabe Masaki)	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・非常勤研究員    (15301)	
研究 協力者	高村 祐太  (Takamura Yuta)	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生    (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	野崎 瑠威  (Nozaki Rui)	岡山大学・薬学部・学部生  (15301)	
研究協力者	櫻井 良憲  (Sakurai Yoshinori)  (20273534)	京都大学・複合原子力科学研究所・准教授  (14301)	
研究協力者	楠本 多聞  (Kusumoto Tamon)  (90825499)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所, 計測・線量評価部・研究員  (82502)	

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
---------	---------