

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870625

研究課題名(和文) ドデカボレートアンモニウムを導入したBNCT用がん親和性ホウ素分子の合成と評価

研究課題名(英文) Synthesis and Biological Evaluation of Ammonioundecahydro-closo-dodecaborate Containing Pharmaceuticals for BNCT

研究代表者

服部 能英 (HATTORI, Yoshihide)

大阪府立大学・地域連携研究機構・講師

研究者番号：50514460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん-ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、新たな可能性を秘めたがんの治療法として注目を集めている。しかしながら、BNCTの臨床研究に実用されているホウ素薬剤は、腫瘍選択性・集積性において十分なものではなく、より効果的な新規ホウ素薬剤の開発が急務となっている。

本研究では、BNCT用薬剤の開発を行うために、1.新規有機合成反応の開発、2.新規ホウ素化合物の合成、3.合成した新規化合物のBNCT用薬剤としての評価の3点について研究を行った。その結果、本研究で確立された新規有機合成反応を利用することで、既存のBNCT用薬剤よりも高い効果を示す有望な新規ホウ素薬剤の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) has attracted attention as a potential treatment for malignant brain tumors. Although many kinds of boron-containing compounds have been reported as boron delivery agents (boron carriers) for BNCT, only two compounds are used for the treatment of brain tumors via BNCT. In order to develop the novel boron pharmaceuticals for BNCT, we studied the following three research theme; i) development of novel reaction for dodecaborate, ii) synthesis of novel dodecaborate containing boron pharmaceuticals, iii) evaluation of novel boron pharmaceuticals. In the results of above study, the useful boron compound for BNCT is synthesized by the novel reaction method for dodecaborate.

研究分野：生物有機化学

キーワード：BNCT ホウ素薬剤 ホウ素アミノ酸 ホウ素クラスター

### 1. 研究開始当初の背景

BNCTは、腫瘍細胞に集積した<sup>10</sup>B-ホウ素原子が熱中性子線と核反応を起し、この時に発生する飛程の短いα粒子およびγ線等によって腫瘍細胞のみを破滅に導く細胞選択的ながん治療法である。これを成功させるためには、腫瘍細胞内に30 ppm以上の<sup>10</sup>B-ホウ素原子を選択的に集積させる必要があり、<sup>10</sup>B-ホウ素原子を送達するホウ素薬剤の開発は、BNCTの成否を決める最重要な要素技術となっている。すなわち、BNCTには、高い腫瘍細胞選択性(T/N比)と高い集積性を併せ持ったホウ素薬剤の開発が不可欠である。

現在、BNCTの臨床研究にはホウ素原子占有率の高いイオン性のドデカボランチオール([B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>-SH]<sup>2-</sup>, BSH、図1)が実用されている。しかし、BSHの腫瘍親和性および腫瘍細胞集積性は低く、BSHに替わるドデカボレート型薬剤の開発が重要な課題となっている。

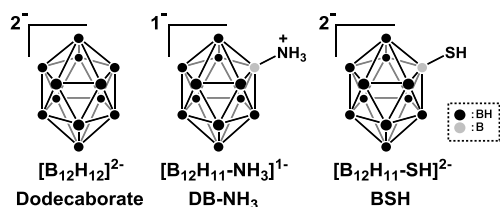


図1 ドデカボレート類

腫瘍選択的なホウ素薬剤開発の有効な手法の一つは、腫瘍親和性分子をホウ酸残基や疎水性カルボラン等のホウ素原子(団)で化学修飾することである。この分子設計コンセプトに基づいて、申請者らも含む多くの研究グループが、これまでに、多くのホウ素化合物を合成・評価してきた(Hattori Y., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 2006など)。しかし、毒性や水溶性がボトルネックとなり、現在に至っても、BNCTに実用される新規なホウ素薬剤は開発されていない。このため、近年では、ホウ素原子団として、毒性が低く水溶性の高いドデカボレートを腫瘍親和性分子に導入した新規なホウ素薬剤の開発が注目されているが、反面、無機イオンのドデカボレートを有機分子に導入する素反応は殆ど確立されておらず、未開拓の分野である。

一方、申請者らは、腫瘍細胞においては増殖に必要なアミノ酸の取り込み能が増大していることに着目して、腫瘍親和性分子として選択したα-L-アミノ酸の側鎖にスルフィド様結合でドデカボレートを導入した種々のα-アミノ酸(図2)を簡便に合成することのできる手法を確立した。これらの腫瘍細胞への集積性、細胞内分布および中性子線照射による殺細胞効果等を評価した(Hattori Y., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2012)。これらの結果、ホウ素薬剤設計においてアミノ酸が腫瘍親和性分子として有望であることが明らかとなった。

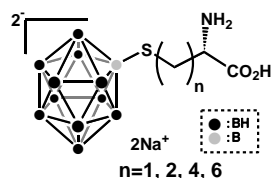


図2 ドデカボレートアミノ酸

このように、ドデカボレートアンモニウム(DB-NH<sub>3</sub>)のように化学的挙動が未解明であるために、腫瘍親和性分子に導入した例が少ないドデカボレートを簡便に腫瘍親和性分子に導入する手法を開発できれば、有用なBNCT用ホウ素薬剤の開発に大きく寄与するものと期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、BNCTに利用できる新規ホウ素薬剤の開発を目的とし、以下の3つの課題について研究を行う。

- (1) DB-NH<sub>3</sub>の有機分子化反応の開発
- (2) DB-NH<sub>3</sub>修飾α-アミノ酸類の合成
- (3) ホウ素薬剤の生物活性評価

具体的には、ドデカボレートアンモニウムDB-NH<sub>3</sub>を有機分子化するための素反応として、アシル化およびアルキル化反応を、構造の簡単なモデル化合物を用いて確立する。これらの結果を腫瘍親和性の高いアミノ酸やペプチドとの反応に応用してDB-NH<sub>3</sub>を導入した新規なドデカボレート含有アミノ酸やペプチドを合成、これらの生物評価とスクリーニングを行って実用的なBNCT用ホウ素薬剤の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) DB-NH<sub>3</sub>の有機分子化反応の開発

ドデカボレートの中で、BNH<sub>3</sub>は窒素原子上に1価のカチオン性を帯びているため、ホウ素クラスターの2価のアニオン性を緩和し、全体として1価のアニオンとなっている。細胞表面にはマイナス電荷の層があるため、窒素原子上にカチオン性を有するBNH<sub>3</sub>は細胞内に取り込まれやすいと考えられる。このため、BNH<sub>3</sub>はBNCT用ホウ素キャリアのホウ素源として非常に魅力的な化合物であると言える。

しかしながら、DB-NH<sub>3</sub>はその反応性自体が未だ明らかになっておらず、一般によく用いられるアミノ基の反応の殆どが限定的な条件でしか進行しない。このために、DB-NH<sub>3</sub>のアシル化反応をホウ素源とするBNCT用薬剤は殆ど合成されていない。DB-NH<sub>3</sub>が特異な反応性を示す主な原因としては、ドデカボランに直結したアミンのプロトンはpKaが20以上であることが挙げられる。このために、クラスター上のアミノ基のプロトンを引き抜いて求核性を持たせることが困難である上、強塩基を用いてプロトンを引き抜いたとしてもDB-NH<sub>3</sub>の塩基性が高いために有機

分子化することは難しい。例えば、 $\alpha$ 位に水素を有するカルボン酸には酸クロリド法を用いても  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  との反応が進行しないという報告がなされている。これは  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  がカルボン酸の  $\alpha$  水素を引き抜いて  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  に戻ってしまい反応が進行しないためである。

本研究では、このように特異な反応性を示す  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  を簡便に有機分子化するための素反応を開発し、アミノ酸などの生理活性物質に  $\text{BNH}_3$  を導入した新規化合物を合成することを目的とした。

#### ① $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$ のアシル化反応

上述のように、酸クロリドを用いて  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  とカルボン酸を縮合する反応は困難である。また、アミド結合を形成する反応に一般によく用いられるジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) などのようなカルボジイミド系の縮合剤との反応では、 $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  の塩基性が高いために縮合剤との間でグアニジン誘導体を形成する副反応が主として進行し、アミド結合を形成する反応が進行しないことが報告されている。

そこで、 $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  をアシル化するにあたり、*p*-ニトロフェノールを用いた活性エステル法を利用したアミド結合形成反応について検討を行うこととした (図3)。活性エステル法は、温かかつ副反応の少ないアミド結合形成反応として知られている。また、活性エステル形成に利用する *p*-ニトロフェノールと  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  との間で副反応は起きづらいと予測されるため、この方法は汎用性が高い  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  の有機分子化反応として期待できる。

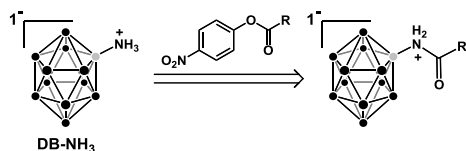


図3  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  のアシル化

モデル反応として安息香酸の  $\text{ONp}$  エステルを用いた  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  のアミド化反応について、最適条件の検討を行った。その結果、 $\text{NaH}$  を 2.5 当量、活性エステル体を 1.5 当量用い、 $50^\circ\text{C}$  で反応を行った場合、最も収率良く反応が進行することが分かった。

本合成法では、これまで  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  を導入できなかった  $\alpha$  水素を有する化合物にも、 $\alpha$  位に水素原子を持たない化合物と同様に  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  を導入することができた。この結果、活性エステル体を用いる今回の合成法は、温和な条件で進行し、汎用性が広く、かつ高収率で  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  を有機分子へ導入可能であることが分かった。

#### ② $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$ のアルキル化反応

$\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  は、ハロゲン化アルキルなどを用いたアルキル化反応を行うとモノ、ジ、トリアルキル体の混合物となり反応の制御を個

なうことが困難であることが報告されている。このため、モノアルキル体を合成するには適切な保護基を導入した後にアルキル化する段階的な手法が有効であると考えられる。そこで本研究では、 $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  にベンズアルデヒドを作用させ、ベンズイミドへと変換した後に、ハロゲン化アルキルを作用させ、段階的にアルキル化する手法について検討を行うこととした (図4)。

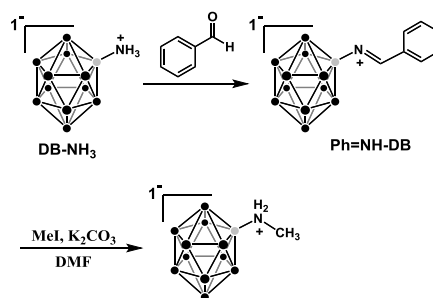


図4  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  のモノアルキル化

モデル反応として、イミド化した  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  ( $\text{Ph}=\text{NH}\cdot\text{DB}$ ) に対してヨードメタンを用いたモノアルキル化について検討を行ったところ、室温下でモノメチル体へと変換することに成功した。しかしながら、本反応では、反応中にイミンが分解してしまうために、どうしても若干のジ、トリアルキル体が混入してしまうことが分かった。さらに、本反応は単純なハロゲン化アルキルを利用する場合には有用であるが、種々のハロゲン化アルキルを有する有機分子に幅広く利用することは難しいことも分かった。今後この結果を基に、より広範な誘導体を利用できる新規反応について検討を行う予定である。

#### (2) $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$ 修飾 $\alpha$ -アミノ酸類の合成

(1) で確立したアミド化反応を用いて生理活性物質に  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  を導入し、新規ホウ素キャリアの開発を試みた。本研究では、有機分子として *L*-フェニルアラニン (*L*-Phe)、*L*-バリン (*L*-Val)、*L*-BPA、ニコチン酸の 4 種を選択した。

腫瘍細胞において、亢進した細胞内代謝を保障するためにアミノ酸の取り込みが亢進している。*L*-Phe、*L*-Val は必須アミノ酸であり、腫瘍集積性が高いと考えられることから、まずこれらへの  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  導入を行った。

一方、*L*-BPA は既に  $\text{BNCT}$  の臨床研究においてホウ素キャリアとして使用されている化合物である。腫瘍細胞表面には過剰にアミノ酸トランスポーターが発現しており、*L*- $^{10}\text{BPA}$  はアミノ酸トランスポーターを介して腫瘍細胞に選択的に集積することが報告されている。*L*- $^{10}\text{BPA}$  に  $\text{DB}\cdot\text{NH}_3$  を導入した分子は、水溶性が向上し、何よりホウ素占有性が高まることによって殺細胞効果が飛躍的に高まると期待される。

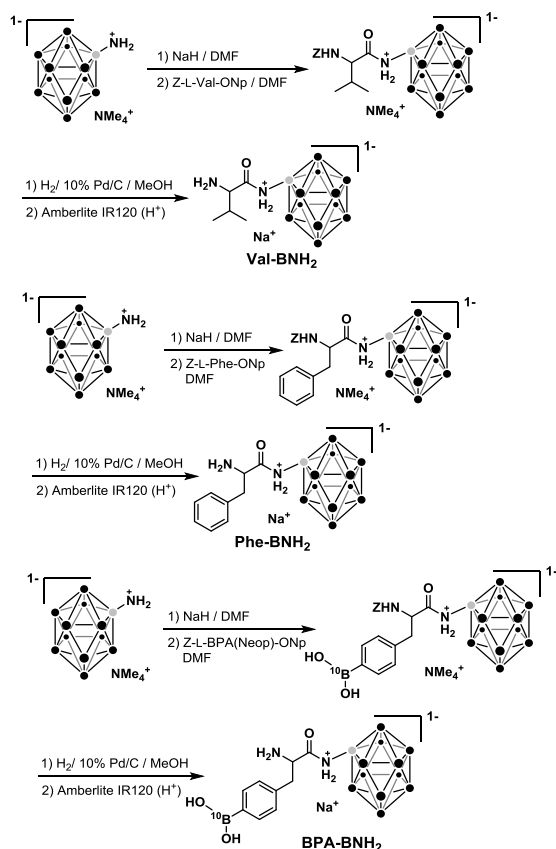


図 5 DB-NH<sub>3</sub> 含有アミノ酸の合成

また、脳腫瘍の低酸素領域では NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) の要求性が増しており、NAD 前駆体であるニコチンアミドの取り込みも亢進していることから、ニコチン酸に DB-NH<sub>3</sub> を導入したニコチン酸アミドの誘導体も腫瘍細胞への高い集積性が期待できる。

まず、市販の Z-L-Phe-OH、Z-L-Val-OH およびを出発物質として、常法に従って活性エステル体をそれぞれ合成した。一方で、塩基性条件下 L-<sup>10</sup>BPA を Z-クロリドと反応させ、アミノ基を保護した。Z-L-<sup>10</sup>BPA に 2,2-dimethyl-1,3-propanediol を作用させ、ホウ酸部位を予め保護してから活性エステル化し、Z-L-<sup>10</sup>BPA(Neop)-ONp を得た。次に、(1)–①で確立した条件を用いて各アミノ酸誘導体へ DB-NH<sub>3</sub> を導入し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製を行い、3 種の DB-NH<sub>3</sub> アミノ酸前駆体を得た。その後、10%Pd-C を用いた接触還元によって Z 基を脱保護し、陽イオン交換樹脂 amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) を用いてドデカボレート Na 塩に変換することで、目的とする 3 種の DB-NH<sub>3</sub> アミノ酸を合成した (図 5)。

ニコチン酸を活性エステル化し、最適条件下 DB-NH<sub>3</sub> を導入した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製を行い、**26** および過剰の活性エステル体が分解したニコチン酸が混合物として得られた。これを

amberlite IR-124 (Na<sup>+</sup>) に通塔することで、テトラメチルアンモニウムカチオンをナトリウム塩に変換し、目的物である NA-BNH<sub>2</sub>・Na を得た (図 6)。

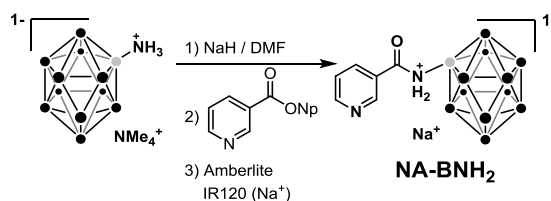


図 6. NA-BNH<sub>2</sub> の合成

### (3) ホウ素薬剤の生物活性評価

合成した 4 種の新規 DB-NH<sub>2</sub> 含有化合物について、培養腫瘍細胞を用いた各種生物活性試験を行い、BNCT 用ホウ素薬剤としての評価を行った。

#### ①細胞毒性試験

各ホウ素薬剤の細胞毒性について、WST-8 法を用いて評価を行った。本試験では、B16 (マウス由来メラノーマ) 細胞、C6 (マウス由来グリオーマ) 細胞、および SAS (ヒト由来扁平上皮ガン) について試験を行った。

この結果、新たに合成した新規ホウ素薬剤の各腫瘍細胞に対する細胞毒性は、いずれも IC<sub>50</sub> 値にして 2mM 以上と非常に低いものであり、これらの化合物は BNCT に利用でき得る非常に毒性の低い化合物であることが明らかとなった。

#### ②腫瘍細胞へ集積試験

合成した 4 種の新規化合物について、腫瘍細胞への取り込み試験を行った (図 7)。また、ポジティブコントロールとして、L-BPA、および先行研究において合成されたドデカボレート含有アミノ酸 C4-BSH-AA についても同様に実験を行った。C4-BSH-AA は、DB-NH<sub>3</sub> と同様にドデカボレートである BSH をアミノ酸に導入した化合物であり、1 分子内にホウ素原子を 12 個有している。

図 8 に示したように、各 DB-NH<sub>2</sub> 含有化合物は、グリオーマ(C6)やメラノーマ(B16)あるいは舌癌 (SAS) などの様々な腫瘍細胞に取り込まれることが確認できた。しかし、その取り込み量は C4-BSH-AA と同程度かそれよりも低いものであった。しかしながら、取り込み量は腫瘍細胞の種類によって大きく異なるため、今後、他の癌腫の細胞に関しても取り込み試験を行い、高濃度に取り込まれる癌腫を検索する予定である。

#### ③ホウ素薬剤の腫瘍細胞内分布

BNCT 用ホウ素薬剤の役割は腫瘍部位にホウ素を送達することが第一であるが、より高い殺腫瘍細胞効果を得るためには、ホウ素薬剤が腫瘍組織内や腫瘍細胞の細胞膜にとどまるのではなく、腫瘍細胞内やその細胞核内に集積することが望ましい。

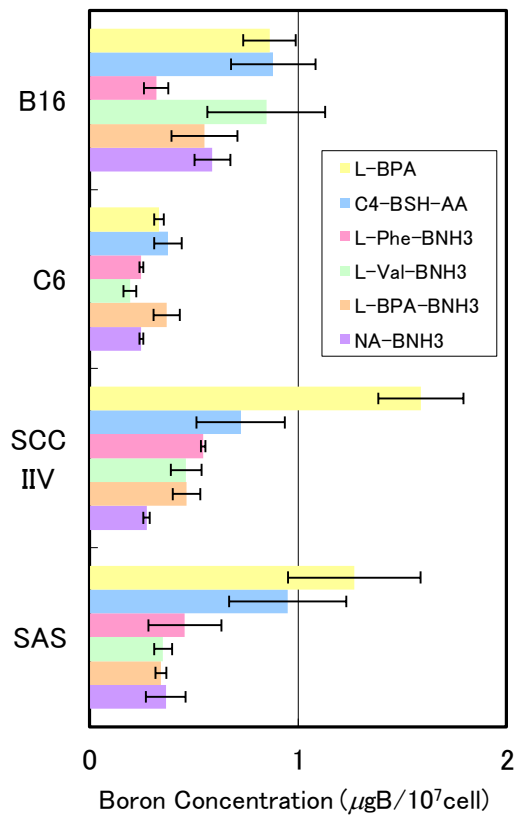


図 7 ホウ素化合物の腫瘍細胞への集積量

表 1. ホウ素化合物の細胞内分布

化合物	細胞の写真	免疫染色	重ねあわせ
Val-BNH <sub>2</sub>			
Phe-BNH <sub>2</sub>			
BPA-BNH <sub>2</sub>			
NA-BNH <sub>2</sub>			

このため、各化合物の細胞内分布を免疫染色法により可視化し、腫瘍細胞の細胞膜内に集積しているかどうかを評価することとした(表1)。この結果、合成した4種の化合物はいずれも細胞内に広く分布していることが明らかとなった。特に BPA-BNH<sub>2</sub> は細胞核内にまで広く分布しており、BNCT用のホウ素薬剤として理想的な細胞内分布を示す化合物であることが分かった。

#### ④ 中性子照射による殺細胞効果試験

実際にBNCTによって腫瘍細胞を死滅させ

ることができるかを評価するために、C6 グリオーマ細胞内に各 DB-NH<sub>2</sub> 含有アミノ酸を取り込ませた後に、京都大学原子炉実験所にて実際に中性子線を照射し、殺細胞効果試験を行った。

この結果を図8に示した。L-Phe-BNH<sub>2</sub> と L-BPA-BNH<sub>2</sub> が特に、BNCTの臨床実験に利用されている L-BPA やドデカボレート有する C4-BSH-AA よりも高い殺細胞効果を示した。この結果は、細胞取り込み試験の結果と相反しているが、細胞内分布や腫瘍細胞内での滞留性などが既存の薬剤よりも優れているためにより高い活性を示したものと考えられる。

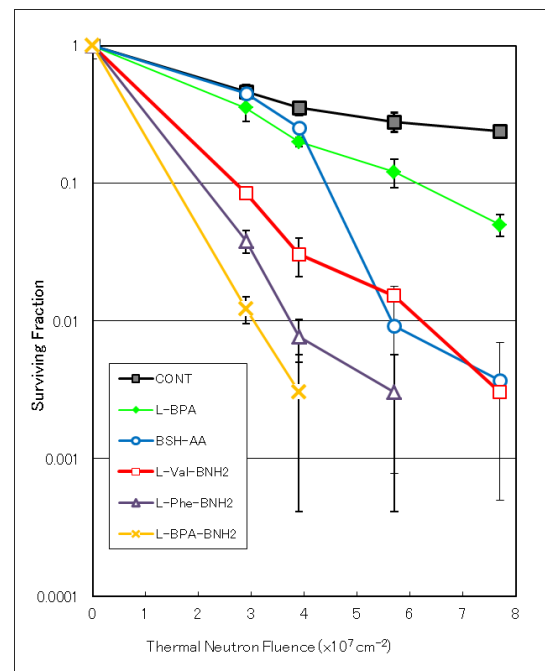


図 8 殺細胞効果試験

#### 4. 研究成果

本研究は、BNCTにおいて最重要課題の一つである新規ホウ素薬剤の開発を目的として展開したものである。この研究の中で、まず、DB-NH<sub>3</sub>を有機分子に導入するための鍵反応として DB-NH<sub>3</sub>のアシル化反応を確立した。そして、これを用いて、アミノ酸などの生体関連分子に DB-NH<sub>3</sub>を導入することに成功し、その中で4種類の新規 DB-NH<sub>2</sub>含有化合物を合成した。さらに、合成した新規化合物のBNCT用ホウ素薬剤としての評価を行い、合成した化合物の中でも L-Phe-BNH<sub>2</sub> と L-BPA-BNH<sub>2</sub> が特に、BNCTの臨床実験に利用されている L-BPA よりも高い効果を示す有用な化合物であることを明らかにした。

前述のように DB-NH<sub>3</sub>のようなドデカボレート類は、その化学的挙動が未解明であるために、有機分子に導入した例が少なく、その化学的な知見は非常に少ない。このため、本研究によって、DB-NH<sub>3</sub>を簡便に有機分子に導入することのできる手法が確立されたことは、有機合成の分野において大きなインパクトを与える結果であるといえる。さらに、

本研究の成果によって合成された化合物は、BNCTの臨床薬として利用されている薬剤よりも高い活性を示す有望な化合物であることから、本研究の成果によって、BNCT用ホウ素薬剤開発のための、非常に重要な知見が得られたと言える。

今後、これらの成果を基により実用的な次世代型のBNCT用ホウ素薬剤開発に進みたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Yoshihide Hattori, Miki Ishimura, Youichirou Ohta, Hiroshi Takenaka, and Mitsunori Kirihata, Visualization of Boronic Acid Containing Compounds in Live Cell using Fluorescent Boron Sensor, *Peptide Science* 2015 (2016), 285-289. 査読有
- ② Yoshihide Hattori, Miki Ishimura, Youichirou Ohta, Hiroshi Takenaka, Tsubasa Watanabe, Hiroki Tanaka, Koji Ono, and Mitsunori Kirihata, Detection of Boronic Acid Derivatives in Cells Using Fluorescent Sensor, *Organic & Biomolecular Chemistry* (2015), 6927-6930. 査読有  
DOI: 10.1039/c5ob00753d
- ③ Yoshihide Hattori, Miki Ishimura, Youichirou Ohta, Hiroshi Takenaka, and Mitsunori Kirihata, Detection of Boron-Containing Amino Acids and Peptides Using Fluorescent Boron-Sensor, *Peptide Science* 2014 (2015), 295-298., 査読有
- ④ Yoshihide Hattori, Shintaro Kusaka, Mari Mukumoto, Miki Ishimura, Yoichiro Ohta, Hiroshi Takenaka, Kouki Uehara, Tomoyuki Asano, Minoru Suzuki, Shin-ichiro Masunaga, Koji Ono, Shinji Tanimori and Mitsunori Kirihata, Synthesis and in vitro evaluation of thiododecaborated  $\alpha$ ,  $\alpha$ -cycloalkyl amino acids for the treatment of malignant brain tumors by boron neutron capture therapy, *Amino Acids*, 2014, 2715-2720. 査読有  
DOI : 10.1007/s00726-014-1829-5
- ⑤ Yoshihide Hattori, Shintarou Kusaka, Saori Ueda, Mari Mukumoto, Youichirou Ohta, Hiroshi Takenaka, Kouki Uehara, Tomoyuki Asano, Minoru Suzuki, Shin-ichiro Masunaga, Koji Ono, Shinji Tanimori and Mitsunori Kirihata, Synthesis and Biological Evaluation of Ammonioundecahydro-*closo*-dodecaborate(1-) Containing Amino Acids Derivatives for BNCT, *Peptide Science* 2013, 2014, 177-180. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 服部能英, ホウ素 - 中性子捕捉療法に用いる次世代型ホウ素薬剤の開発, 第18回癌治療増感シンポジウム, 2016年2月5日, 奈良県文化会館 (奈良県奈良市)
- ② 服部能英, アンモニオドデカボレートのアシル化反応を利用したドデカボレート含有アミノ酸誘導体の合成と評価, 日本薬学会第134年会, 2014年3月28日, 熊本大学 (熊本県熊本市)
- ③ 服部能英, ドデカボレート含有アミノ酸類のホウ素キャリアーとしての評価, 第12回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2015年9月4日, 神戸学院大学(兵庫県神戸市)
- ④ 服部能英, がん-ホウ素中性子捕捉療法のためのホウ素薬剤の開発研究, 4th Biomedical Forum, 2015年9月2日, 大阪府立大学(大阪府堺市)
- ⑤ 服部能英, Design and Synthesis of Tumor Seeking *closo*-Dodecaborate-Containing Amino Acids as Boron Carrier for BNCT, 15th International Congress on Neutron Capture Therapy, 2014年6月15日, ヘルシンキ (フィンランド)
- ⑥ 服部能英, Synthesis and Biological Evaluation of Ammonioundecahydro-*closo*-dodecaborate(1-) Containing Amino Acids Derivatives for BNCT, 4th APIPS/50th JPS, 2013年11月7日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市, )
- ⑦ 服部能英, ドデカボレート含有アミノ酸の *in vitro*における生理活性評価, 第10回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2013年9月7日, 岡山大学 (岡山県岡山市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 能英 (HATTORI, Yoshihide)  
大阪府立大学・地域連携研究機構・講師  
研究者番号 : 50514460