

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461895

研究課題名(和文) 高特異性ホウ素中性子捕捉療法薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of High specific reagents for BNCT

研究代表者

富永 英之(Tominaga, Hideyuki)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：00393348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：L型中性アミノ酸トランスポーターの代表的なアイソフォームとして、LAT1とLAT2があり、LAT1はがん細胞特異的であり、LAT2は正常細胞に分布する。両者の輸送アミノ酸基質選択性にも違いがあり、LAT2が中性アミノ酸全般を輸送するのに対して、LAT1は主に大型の中性アミノ酸(ロイシン、チロシンなど)を輸送される。

我々が開発したメチルチロシンはLAT1に選択性の高いアミノ酸誘導体である。研究期間中もこの有用性については報告してきた。しかしながら、ホウ素中性子捕捉療法用薬剤としては、水溶性の向上できず、また複数のホウ素の導入により、LAT1自体の選択性が低下するなど薬剤開発が実現しなかった。

研究成果の概要(英文)：Representative isoforms of L-type neutral amino acid transporter include LAT1 and LAT2, LAT1 is specific to cancer cells, and LAT2 is distributed in normal cells. There is also a difference in the transport amino acid substrate selectivity of both, while LAT 2 transports all neutral amino acids, whereas LAT 1 mainly transports large neutral amino acids (leucine, tyrosine, etc.). Alpha-methyl tyrosine developed by us is an amino acid derivative with high selectivity for LAT1. I reported this usefulness during the research period. However, as a drug for boron neutron capture therapy, it was not possible to improve water solubility, and due to the introduction of a plurality of boron, drug development such as a decrease in selectivity of LAT 1 per se was not realized.

研究分野：放射線化学

キーワード：ホウ素 BNCT アミノ酸 LAT1 腫瘍特異的

1. 研究開始当初の背景

L型中性アミノ酸トランスポーター(LAT)の代表的なアイソフォームとして、LAT1とLAT2があり、LAT1はがん細胞特異的であり、LAT2は正常細胞に分布する。両者は輸送アミノ酸基質選択性にも違いがあり、LAT2が中性アミノ酸全般を輸送するのに対して、LAT1は主に大型の中性アミノ酸(ロイシン、チロシンなど)を輸送し、LAT2では輸送されない α -メチルチロシンや α -メチルドーパも輸送する。

膵臓がんは早期診断ならびに治療が困難であり、有効な治療法が期待される。研究代表者の富永らは膵臓がんのLAT1発現解析を多数例で行い、LAT1高発現群は低発現群と比較して術後の予後が悪いことを明らかにしている。したがってLAT1特異的な薬剤によるホウ素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)は、膵臓がんの治療戦略として開発する意義がある。

2. 研究の目的

BNCTは腫瘍細胞に集積性の高いホウ素標識薬剤を用いて、中性子とホウ素に捕捉されて二次的に発生するアルファ線により治療する方法である。アルファ線は飛程が短いため、限局した治療が可能であり、正常細胞への影響が小さい治療法である。

現在、使用されているBPA(ホウ化フェニルアラニン)はアミノ酸の誘導体であり、アミノ酸トランスポーターによって取り込まれている。我々はその機序に着目し、腫瘍特異的なアミノ酸トランスポーターLAT1により特異的に輸送されるBNCT用候補薬剤のPET用標識化合物を作成し、腫瘍モデルの体内分布ならびに腫瘍集積性を定量評価して新規BNCT用薬剤を開発する。

3. 研究の方法

[^{18}F]FAMTは腫瘍に特異的なL型中性アミノ酸トランスポーター1(LAT1)により細胞内に取り込まれるため、FAMTをLAT1アッセイに応用すれば、従来のアッセイ系より特異性の高い評価系となる。まず[^{14}C -carbonyl]FAMTによる評価系を確立させる。

BPAの α 位をアルキル化したBPAを合成し、前述のLAT1アッセイでスクリーニングを行い、有効な候補化合物を同定する。それらの結果に基づき、BNCT用候補薬剤の化合物として[^{18}F]標識体を合成し、担がんマウスにおける体内分布を動物PETにて評価する。

4. 研究成果

(1) [^{14}C -carbonyl]FAMTによる評価系の確立

LAT1は通常、基質取り込みおよび基質放出試験を[^{14}C]L-ロイシンを用いて行うが、L-ロイシンはLAT1、LAT2の双方に作用するため、特異性の高い[^{14}C -carbonyl]L-FAMTの方がLAT1の作用を反映しており、LAT1特異的な基質の取り込みおよび放出試験を確立する。陰性標準物質としてD-FAMTを用いて評価する。腫瘍特異的に発現する中性アミノ酸トランスポーター(LAT1)を評価するために、フルオロ α -メチルチロシン(FAMT)の炭素-14標識体の合成を検討し、既知である[^{14}C -carbonyl]チロシンの合成と同様にブヘラ・ベルクス反応を用い、小規模で、カルボニル基の炭素を炭素-14に置換した[^{14}C -carbonyl]L-FAMT合成に成功した。品質については、下記純度のものを得ることができた。化学純度95.7%、放射化学的純度97.8%、光学異性体純度99.0%ee。詳細については第54回日本核医学会学術総会(大阪)にて発表を行った。

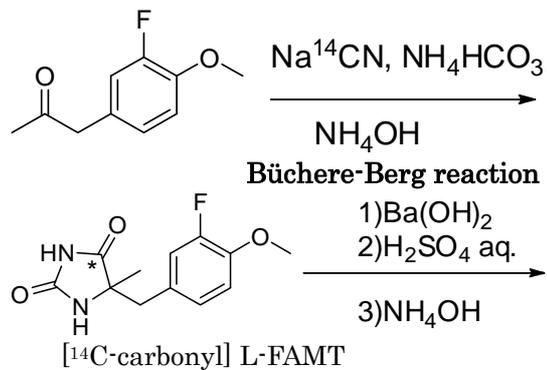


図 [^{14}C -carbonyl] L-FAMTの合成
(富永英之、第54回日本核医学会学術総会)

合成した[^{14}C -carbonyl]L-FAMTを用いて、LAT1と正常組織型であるLAT2と比較したところ、[^{14}C -carbonyl]L-FAMTはLAT2にはほとんど取り込まず、LAT1特異的な基質であることが確認された。その性質を利用して、[^{18}F]FAMT-PETで確認された腎集積の分子機序を[^{14}C -carbonyl]L-FAMTを用いて解明に寄与した。この件に関しては第88回日本薬理学会年会(名古屋)にて報告した。[^{14}C -carbonyl]L-FAMTの評価により、LAT1による集積解析にFAMTの重要性が増した。

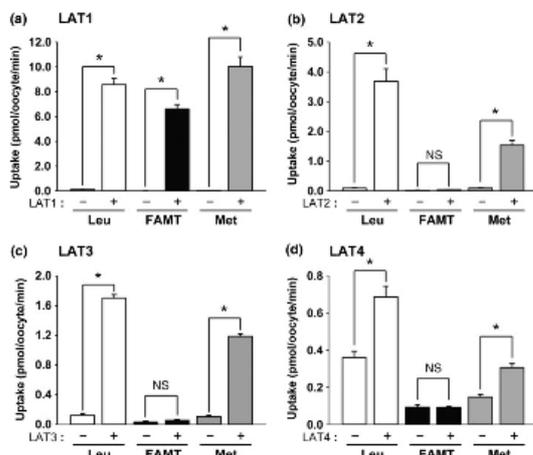


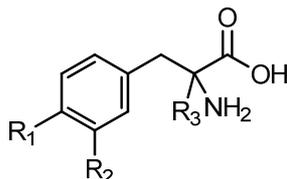
図 LATのサブタイプにおけるFAMTとメチオニンの基質特異性

腫瘍のアミノ酸トランスポーターのPET用薬剤として汎用されているメチオニンとFAMTの特異性を検討した。メチオニンはLATのサブタイプ(LAT1-4)に特異性は確認できないが、FAMTはLAT1に特異的なトランスポーターPET用薬剤である。

Ref. Wei L, Tominaga H et al., Cancer Sci. 2016 107(3): 347-352.

(2) 次世代BNCT用薬剤の開発

BPAを母骨格として候補化合物の合成を行い、候補化合物については下記に示したとおりであった。



- | | | | |
|---|------------------------------------|-------------------|--------------------|
| A | R ₁ =B(OH) ₂ | R ₂ =H | R ₃ =H |
| B | R ₁ =B(OH) ₂ | R ₂ =F | R ₃ =H |
| C | R ₁ =OH | R ₂ =H | R ₃ =Me |
| D | R ₁ =OH | R ₂ =F | R ₃ =Me |
| 1 | R ₁ =B(OH) ₂ | R ₂ =H | R ₃ =Me |
| 2 | R ₁ =B(OH) ₂ | R ₂ =F | R ₃ =Me |
| 3 | R ₁ =B(OH) ₂ | R ₂ =H | R ₃ =Et |
| 4 | R ₁ =B(OH) ₂ | R ₂ =F | R ₃ =Et |

図 ホウ素中性子捕捉療法用薬剤候補品

上図より 化合物AはBPAであり、化合物BはBPAをフッ素化したPET薬剤であるFBPAであり、化合物CはFAMTの前駆体である -メチル化したチロシンである -メチルチロシンであり、化合物DがFAMTである。ホウ素化学は通常の有機合成とは異なり、難航した。また -メチル化を行うことにより、水溶性の低下が大きく、粗製の段階で生化学実験に用いることのできるものを得ることはできなかった。BNCTには病変局所に対するホウ素濃度が極めて重要であり、高濃度の溶液にするか、一分子当りのホウ素量を上げるしかないのだが、シクロデキストリ

ン等の溶解補助剤を用いるなどしたが、目的は達成しなかった。しかしながら、BNCTへの可能性については研究協力者である大阪大学金井から、BPAではあるが、LAT1の基質になることを報告した。またBNCTにおけるLAT1の重要性について第11回日本中性子捕捉療法学会学術大会(大阪)にて報告をし、情報発信も行った。

表 BPAの各トランスポーターにおけるパラメーター

Transporter	K _m μM	V _{max} pmol/oocyte/min
ATB ⁰⁺	137.4 ± 11.7	19.7 ± 0.9
LAT1	20.3 ± 0.8	1.32 ± 0.2
LAT2	88.3 ± 5.6	5.8 ± 0.9

Values represent the mean ± SEM of three separate experiments. K_m, Michaelis-Menten constant.

Ref. Kanai Y et al., Cancer Sci. 2015, 106, 279-286

(3) BNCT用PET薬剤の開発

この検討でも用いられているFAMTはフッ素-18を標識した薬剤として、臨床研究が行われている。

この研究期間中にもLAT1や悪性度への関係について、報告がされている。下図に示した通り、共同研究者である解良らは進行性の肺がん患者の治療のモニタリングについて報告している。FAMT PETは、進行した肺がんを有する患者における第一選択化学療法後の予後を予測するための潜在的パラメーターであり得る。

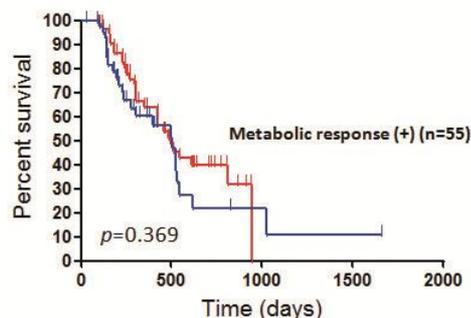
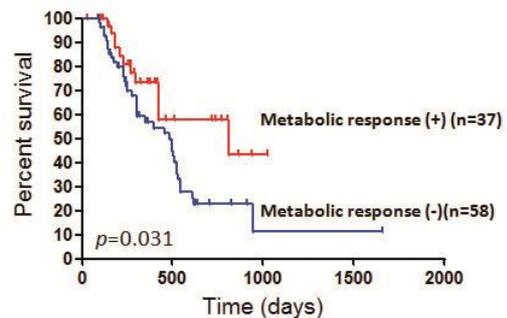


図 FAMT-PET(上図)及びFDG-PET(下図)による代謝的応答(MR: Metabolic Response)変化による進行性肺がん患者の

予後経過

Ref. Kaira K, [Tominaga H](#) et al.,
Anticancer Res. 2016 36(12): 6481-6490.

今回は標的として、モノマーのアミノ酸またはモノマーのアミノ酸誘導体について検討を行ってきた。しかしながら、BNCTでは水溶性も重要なファクターであり、現在の検討では治療へ向かうには困難である。

標的物質をオリゴペプチドに移行させ、水溶性を向上させるとともに、ホウ素クラスターを導入することにより、必要量を下げる検討などが必要と考えられる。今後の発展が大いに期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1) Shimizu A, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.,
“Prognostic impact of LAT1 and CD98 expression in cutaneous angiosarcoma.”
Neoplasma. 2017, 64(2), 283-288.
doi: 10.4149/neo_2017_216.
査読有

2) Kaira K, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.,
“Usefulness of 18F- α -Methyltyrosine PET for Therapeutic Monitoring of Patients with Advanced Lung Cancer.”,
Anticancer Res. 2016 36(12): 6481-6490.
査読有

3) Takeishi Y, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.,
“Cardiac imaging with 18F-fluorodeoxyglucose PET/MRI in hypertrophic cardiomyopathy.”
J Nucl Cardiol. 2016 Oct 14. [Epub ahead of print]
査読有

4) Masuda A, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.,
“Inflammatory involvement in a patient with Leriche syndrome evaluated by 18F-fluorodeoxyglucose PET/MRI.”,
J Nucl Cardiol. 2016 Sep 20. [Epub ahead of print]
査読有

5) Ohshima Y, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.,
“Efficacy of LAT1 inhibition as a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma.”

Cancer Sci. 2016 Jul 28. [Epub ahead of print]
査読有
doi: 10.1111/cas.13021.

6) Wei L, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.,
“Transport of 3-fluoro-L- α -methyl-tyrosine (FAMT) by organic ion transporters explains renal background in [(18)F]FAMT positron emission tomography.”
J Pharmacol Sci. 2016; 130(2): 101-9. 査読有
doi: 10.1016/j.jphs.2016.01.001.

7) Wei L, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.
Specific transport of
“3-fluoro-l- α -methyl-tyrosine by LAT1 explains its specificity to malignant tumors in imaging,”
Cancer Sci. 2016 Mar; 107(3): 347-52.
査読有

8) Nagamori S, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.
“Structure-activity relations of leucine derivatives reveal critical moieties for cellular uptake and activation of mTORC1-mediated signaling.”,
Amino Acids. 2016; 48(4): 1045-1058.
査読有

9) Kaira K, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.
“Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in patients with ovarian tumors.”,
Am J Transl Res. 2015 15; 7(6):1161-71.
査読有

10) Shimizu A, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.
“Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in cutaneous melanoma.”
Melanoma Res. 2015 25(5): 399-405.
査読有

11) Yamaguchi A, [Tominaga H](#), [Oriuchi N](#) et al.
“Differentiation of malignant tumours from granulomas by using dynamic [(18)F]-fluoro-L- α -methyltyrosine positron emission tomography”.
EJNMMI Res. 2015; 5: 29
査読有

[学会発表](計 3 件)

1) 富永英之他,
”福島県立医科大学 先端臨床研究センターの放射性薬剤への取り組み”

第 78 回 日本核医学会 北日本地方会、
第 133 回日本医学放射線学会 北日本地方会
(共同開催)

2015 年 10 月 23 日 (宮城県仙台市)

2) Ling Wei, 富永英之他、
”3-fluoro-L- α -methyltyrosine(FAMT)PET
における腎臓集積の分子機序の解明”.

第 88 回 日本薬理学会

2015 年 3 月 18 日 (愛知県名古屋市)

3) 富永英之他、
”Development of Measurement for Activity
of L-type neutral amino acid transporter
using [14 C, carbonyl]-3-fluoro- α -methyl-
L-tyrosine ([14 C]-FAMT).”

第 54 回日本核医学会学術総会

2014 年 10 月 17 日 (大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 報告なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富永英之 (TOMINAGA, Hideyuki)

福島県立医科大学・

先端臨床研究センター・准教授

研究者番号 : 00393348

(2)研究分担者

織内 昇 (ORIUCHI, Noboru)

福島県立医科大学・

先端臨床研究センター・教授

研究者番号 : 40292586

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

金井好克 (KANAI, Yoshikatsu)

大阪大学・医学系研究科・薬理学・教授