

氏名	たかだ しんや 高田 慎也
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	甲博薬第3号
学位授与の日付	令和5年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ホウ素中性子捕捉療法用ホウ素-10含有薬剤の高感度 蛍光分析のための蛍光センサーの開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 平野 智也 (副査) 教授 天満 敬 (副査) 教授 大桃 善朗

論文内容の要旨

がんはわが国における最大の死因であり、超高齢化社会を迎えがんによる死亡者数は今後も増加すると考えられている。ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy、BNCT) は ^{10}B 原子と熱中性子線との $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応により生じる高 LET 放射線 (α 線、Li 反跳原子核) を利用するがん治療法であり、その飛程の長さ (4-9 μm) 故に予め ^{10}B 原子をがん細胞内に集積させることができれば、がん細胞を選択的に傷害することができる。2020 年に ^{10}B 薬剤 4- ^{10}B]borono-L-phenylalanine (BPA) が加速器熱中性子線照射装置とともに薬事承認され、切除不能な局所進行又は局所再発頭頸部がんに対する優れた治療効果を示していることから、他がん種への BNCT 適用を拡大し得る新たな ^{10}B 薬剤開発が切望されている。 ^{10}B 薬剤開発にあたっては、 $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応により生じる短飛程高 LET 放射線が DNA 等を効率的に傷害するか調べるため、細胞内における ^{10}B 分布を評価する必要があるが、現状その方法は確立されていない。簡便かつ信頼性の高い細胞内 ^{10}B 分布評価法を開発できれば、 ^{10}B 薬剤開発に大きく貢

献し得ると期待される。そこで本研究では、定性・定量分析のいずれにも適用可能な蛍光分析法の特徴に着目し、 ^{10}B 含有部位として頻用されるボロン酸構造を標的とした高感度定性・定量分析のための蛍光センサーの開発を計画した。

新規ボロン酸蛍光センサーの開発にあたり、第 1 章・第 2 章で既存センサー DAHMI の問題点である①ボロン酸との低反応性、②蛍光特性の悪さ、を解決し得る分子設計の検証を順次行い、第 3 章でこれらを統合して新規センサーを設計・合成しその有効性を明らかとした。

第 1 章では、DAHMI のボロン酸との反応速度の改善を目的としてボロン酸捕捉部位の可動性が錯形成反応速度に影響する可能性に着目し、DAHMI 基本骨格中の (methylimino)methyl 基を pyridyl 基へと変更した 2-(2-pyridyl)phenol 骨格を有する PPN-1 を設計・合成してその有効性を調べた。その結果、DAHMI は BPA 添加後 120 分経過しても蛍光強度が最大値に至らなかった一方で、PPN-1 は BPA 添加後 5 分以内に最大値に達し、その後 120 分間一定値を示した。このことから、ボロン酸捕捉部位の分子運動を抑制する本分子設計がボロン酸との反応速度の向上に有効である可能性を認めた。なお、PPN-1 の量子収率は DAHMI と同等で、BPA 添加後に添加前比 15 倍以上の蛍光を示し、その強度は BPA 濃度との間に高い直線性を示した。

第 2 章では、DAHMI の蛍光特性の改善を目的として基本骨格への電子供与性部位の導入が有効である可能性に着目し、DAHMI の基本骨格である (E)-2-[(methylimino)methyl]phenol に 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分を導入した BS-631 を設計・合成してその有効性を調べた。その結果、BS-631 は (E)-2-[(methylimino)methyl]phenol と比較して、150 nm 以上の極大蛍光波長の長波長化と 1.7 倍のストークスシフトの拡大を示し、同基本骨格に diethylamino 基を有する DAHMI と比較しても 200 nm 以上の極大蛍光波長の長波長化と 10 倍のストークスシフトの拡大を示した。このことから、ボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善に 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分の導入が有効である可能性を認めた。なお、BS-631 は蛍光極大波長が 631 nm と大きく長波長化したことから、固定化細胞において一般的な核染色試薬との共染色が可能となり、有用な蛍光試薬となる可能性を認め

た。

第3章では新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発を目的として、第1章の知見から高いボロン酸反応性と量子収率が期待できる2-(2-hydroxyphenyl)-1*H*-benzimidazoleを基本骨格とし、第2章の知見から蛍光波長の長波長化とボロン酸反応前の蛍光強度抑制が期待できる1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine部分を導入したBITQを設計・合成してその有効性を調べた。その結果、BITQは所期の通り、ボロン酸反応後の高い量子収率、高い蛍光強度 Post/Pre 比、ボロン酸との速やかな反応性、蛍光波長の長波長化、およびストークスシフトの拡大を示した。BITQはDAHMIと比べ、10倍以上の量子収率、ボロン酸との反応性の高速化、およびストークスシフトの4倍以上の拡大を示し、次世代の高感度ボロン酸蛍光センサーとしてDAHMIに置き換わるに足る十分な性能を有することが明らかとなった。これらの優れた特性に基づき、BITQを用いてマウス血液中BPAの定量を試みたところ、ICP-MS法による定量値との間に傾き1.0の直線的な相関関係を示したことから、BITQは固定化を要しない生細胞内ボロン酸分布の可視化のみならず、臨床BNCTにおける血液中BPA濃度定量にも使用し得る有効なボロン酸蛍光センサーである可能性が示された。

以上本研究において、¹⁰B薬剤開発のボトルネックである細胞内¹⁰B分布評価法の開発のためには蛍光分析法のための新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発が重要と考え、既存センサーの有する諸問題点を解決し、得られた分子設計に関する考察を基盤にそれらを統合して優れた特性を有する新規高感度ボロン酸蛍光センサーBITQを開発した。これらの知見は、今後の¹⁰B薬剤開発研究およびBNCT領域における生物・医学的研究の発展に有用な情報と手段を提供するものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

がんはわが国における最大の死因であり、超高齢化社会を迎えがんによる死亡者数は今後も増加すると考えられている。ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) は ^{10}B 原子と熱中性子線との $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応により生じる高LET放射線 (α 線、Li反跳原子核) を利用するがん治療法であり、その飛程の長さ (4-9 μm) 故に予め ^{10}B 原子をがん細胞内に集積させることができれば、がん細胞を選択的に傷害することができる。2020年に ^{10}B 薬剤4-[^{10}B]borono-L-phenylalanine (BPA) が加速器熱中性子線照射装置とともに薬事承認され、切除不能な局所進行又は局所再発頭頸部がんに対する優れた治療効果を示していることから、他がん種へのBNCT適用を拡大し得る新たな ^{10}B 薬剤開発が切望されている。 ^{10}B 薬剤開発にあたっては、 $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応により生じる短飛程高LET放射線がDNA等を効率的に傷害するか調べるため、細胞内における ^{10}B 分布を評価する必要があるが、現状その方法は確立されていない。簡便かつ信頼性の高い細胞内 ^{10}B 分布評価法を開発できれば、 ^{10}B 薬剤開発に大きく貢献し得ると期待される。

本研究では、定性・定量分析のいずれにも適用可能な蛍光分析法の特徴に着目し、 ^{10}B 含有部位として頻用されるボロン酸構造を標的とした新規蛍光センサーの開発を行った。センサーの開発にあたり、既存センサーDAHMIの問題点である、ボロン酸との反応速度の改善と蛍光特性の悪さを解決し得る分子設計の検証を順次行い、続いてこれらを統合して新規センサーを設計・合成した。

DAHMIのボロン酸との反応速度の改善に関しては、ボロン酸捕捉部位の可動性が錯形成反応速度に影響する可能性に着目した。具体的には、DAHMI基本骨格中の(methylimino)methyl基をより剛直な構造であるpyridyl基へと変更した2-(2-pyridyl)phenol骨格を有する、新規蛍光センサーPPN-1を設計・合成し、その機能を解析した。その結果、DAHMIはBPA添加後120分経過しても蛍光強度が最大値に至らなかった一方で、PPN-1はBPA添加後5分以内に最大値に達し、その後120分間一定値を示した。このことから、ボロン酸捕捉部位の分子運動を抑制する本分子設計がボロン酸との反応速度の向上に有効であることを示した。

DAHMIの蛍光特性の改善に関しては、基本骨格への電子供与性部位の導入が有効である可能性に着目した。DAHMIの基本骨格である(E)-2-[(methylimino)methyl]phenolに1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine部分を導入したBS-631を設計・合成し、その機能を

解析した。その結果、BS-631は(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenolと比較して、150 nm以上の極大蛍光波長の長波長化と1.7倍のストークスシフトの拡大を示し、同基本骨格にdiethylamino基を有するDAHMIと比較しても200 nm以上の極大蛍光波長の長波長化と10倍のストークスシフトの拡大を示した。このことから、ボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善に1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine部分の導入が有効であることを示した。なお、BS-631は蛍光極大波長が631 nmと大きく長波長化したことから、固定化細胞において一般的な核染色試薬との共染色が可能となり、有用な蛍光試薬となることが示された。

最後に新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発を目的として、先の研究で得られた知見から高いボロン酸反応性と量子収率が期待できる2-(2-hydroxyphenyl)-1*H*-benzimidazoleを基本骨格とし、蛍光波長の長波長化とボロン酸反応前の蛍光強度抑制が期待できる1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine部分を導入したBITQを設計・合成して、その機能を解析した。その結果、BITQは所期の通り、ボロン酸反応後の高い量子収率、高い蛍光強度Post/Pre比、ボロン酸との速やかな反応性、蛍光波長の長波長化、およびストークスシフトの拡大を示した。BITQはDAHMIと比べ、10倍以上の量子収率、ボロン酸との反応の高速化を示し、次世代の高感度ボロン酸蛍光センサーとしてDAHMIに置き換わるに足る機能を有することが明らかとなった。これらの優れた特性に基づき、BITQを用いてマウス血液中BPAの定量を試みたところ、ICP-MS法による定量値との間に相関関係を示した。以上の結果から、BITQは生細胞内のボロン酸分布の可視化のみならず、臨床におけるBNCT適用時の血液中BPAの定量にも使用し得る、新規蛍光センサーであることを示した。

本研究では、¹⁰B 薬剤開発のボトルネックである細胞内 ¹⁰B 分布評価法構築のための新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発を行った。既存センサーの問題点を改良するだけでなく、得られた分子設計に関する知見を統合することによって、画期的な機能を持つ蛍光センサーBITQの開発に成功した。これらの知見は、今後の¹⁰B 薬剤開発およびBNCT領域における生物・医学的研究の発展に重要な研究成果である。

以上により、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。