

氏名（本籍）	うえ だ ひろ き 上 田 大 貴（埼玉県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第51号
学位授与の日付	2022年3月19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	<b>Development of Boron Carriers Equipped with Mono- and Dimeric Macrocyclic Polyamines and Their Zinc(II) Complexes for Boron Neutron Capture Therapy</b> (ホウ素中性子捕捉療法のための大環状ポリアミン単量体、二量体およびその亜鉛錯体を有するホウ素キャリアーの開発)

論文審査委員	(主査) 教授 青木 伸
	教授 秋本 和憲      教授 和田 猛
	教授 月本 光俊      教授 倉持 幸司

## 論文内容の要旨

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary therapeutic method for the treatment of certain type of cancers such as malignant glioma, malignant melanoma and recurrent head and neck cancer and is based on a combination of boron ( $^{10}\text{B}$ ) delivery agents and thermal neutron radiation. The nuclear reaction between  $^{10}\text{B}$  atoms and thermal neutrons ( $^1\text{n}$ ) yield heavy particles,  $^4\text{He}^{2+}$  ( $\alpha$ ) and  $^7\text{Li}^{3+}$  ions, which induce the destruction of biomolecules within short path length of 5–9  $\mu\text{m}$ , resulting in that cytotoxic effect is limited to cells that contain  $^{10}\text{B}$ . To date, only two boron-containing drugs, sodium mercaptoborate (BSH) and L-4-boronophenylalanine (BPA) have been used for clinical cancer treatment, and both have some drawbacks in terms of the tumor type that can be treated. Therefore, the discovery of more efficient and less toxic boron delivery agents would be highly desirable. This background has prompted us to develop the novel boron delivery agents functionalized with macrocyclic polyamine scaffolds such as [9]aneN<sub>3</sub>, [12]aneN<sub>4</sub>, and [15]aneN<sub>5</sub> and their Zn<sup>2+</sup> complexes. In this manuscript, we report on the design, synthesis and

biological evaluation of boron-containing mono- and dimeric macrocyclic polyamines and their  $Zn^{2+}$  complexes for boron neutron capture therapy.

In Chapter 2, we report on the design and synthesis of boron carriers equipped with 9-, 12-, and 15-membered macrocyclic polyamines and the corresponding  $Zn^{2+}$  complexes. It is known that polyamines are essential molecules for various cellular functions including protein synthesis and DNA replication, and that an increase in the concentration of them associated with a cell growth activation of cancer cells. In addition, it has been known that macrocyclic polyamines form stable complexes with intracellular metal ions and that  $Zn^{2+}$ -[12]aneN<sub>4</sub> complexes selectively recognize with thymidine (dT) part in DNA. Therefore, we expected that macrocyclic polyamines having boron units would be efficiently uptaken into cancer cells and that the thermal neutron irradiation would induce effective DNA damage when <sup>10</sup>B atoms are accumulated near DNA molecules. In this study, we synthesized monomeric [9]aneN<sub>3</sub>, [12]aneN<sub>4</sub>, and [15]aneN<sub>5</sub> compounds containing cyclic boron ester units in natural abundant ratio (<sup>10</sup>B/<sup>11</sup>B = 19.9/ 80.1) and examined their biological activities such as cytotoxicity and intracellular uptake. Thereafter, some promising compounds were selected and their corresponding <sup>10</sup>B-enriched forms were prepared for BNCT experiments. It was found that these monomeric <sup>10</sup>B carriers were efficiently taken up to cancer cells (A549 and HeLa S3 cells) possibly via polyamine transport system. In addition, the results of in vitro BNCT studies indicate that [12]aneN<sub>4</sub>- and [15]aneN<sub>5</sub>-type <sup>10</sup>B-enriched macrocycles effectively inhibit the proliferation of cancer cells upon thermal neutron irradiation, possibly via the interaction with DNA.

In Chapter 3, we report on the design and synthesis of DNA-targeting boron agents that are bound with homo- and hetero-dimers of macrocyclic polyamines and their corresponding  $Zn^{2+}$  complexes. It was expected that the dizinc(II) complexes of these ligands would interact with two adjacent thymidine (thymidyl(3'-5')thymidine, d(TpT)) units, resulting in more efficient contact with DNA and its more efficient breakdown upon irradiation with thermal neutrons. In this work, the boron-containing macrocyclic polyamine dimers and the corresponding  $Zn^{2+}$  complexes were synthesized. We examined their interaction with calf-thymus DNA (ctDNA) and evaluated their cytotoxicity and intracellular uptake activity using both cancer and normal cell lines. It was found that homo- and heterodimer of macrocyclic polyamines and their  $Zn^{2+}$  complexes interact with double-stranded DNA and that they are much less cytotoxic than the monomers. The results of in vitro BNCT experiments using <sup>10</sup>B-enriched forms of selected compounds indicate that the cytotoxic effect of dimeric <sup>10</sup>B carriers is almost same as that of <sup>10</sup>B-BPA and weaker than that of the monomeric [12]aneN<sub>4</sub>- and [15]aneN<sub>5</sub>-type macrocycles reported in Chapter 2, possibly due to their lower boron uptake and unexpected interactions with intracellular biomolecules. These data

suggest that the  $^{10}\text{B}$  carriers based on monomeric [12]aneN<sub>4</sub> and [15]aneN<sub>5</sub> described in Chapter 2 are preferable for BNCT than ditopic macrocyclic polyamine-type  $^{10}\text{B}$  carriers.

In conclusion, we have successfully developed the novel candidates for DNA-targeting BNCT agent equipped with mono- and dimeric macrocyclic polyamines and their Zn<sup>2+</sup> complexes. We believe that these findings afford important and useful information regarding the fundamental chemistry of boron containing drugs and the design and synthesis of safer and more efficient BNCT agents.

## 論文審査の結果の要旨

放射線治療法の一つであるホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、質量数 10 のホウ素原子 ( $^{10}\text{B}$ ) と熱中性子の核反応により発生した He ( $\alpha$ 線) と Li 粒子によりがん細胞を殺傷する治療法である。また、BNCT ではホウ素薬剤が集積したがん細胞選択的な重粒子線照射という特徴から、再発性・多発性のがんに対しても有効であることが期待されている。しかしながら、臨床で使用可能なホウ素薬剤は 4-boronophenylalanine (BPA) と mercaptoborate (BSH) の 2 種類に限定され、これらの腫瘍滞留性・選択性などが不十分であることから、治療効果の向上や適応癌腫の拡大に向けて新規ホウ素薬剤の開発が求められている。これまでにポルフィリンやアミノ酸、糖などの生体分子にホウ素クラスターであるカルボランやボロン酸を修飾したホウ素化合物の開発が精力的に行われているが、細胞毒性や集積性が問題となり有効なホウ素薬剤は見出されていない。前述のように BNCT の治療効果はホウ素薬剤のがん細胞選択的な集積が極めて重要であることから、申請者はがん細胞におけるポリアミン代謝に着目し、大環状ポリアミン骨格を基盤とするホウ素キャリアーの開発に着手した。

第 2 章では、がん細胞選択的に集積するホウ素薬剤の創製に向け、9~15 員環の大環状ポリアミン単量体を有するホウ素キャリアーの開発を行った。増殖が盛んながん細胞ではポリアミン濃度が上昇し、スペルミジンやスペルミンなどの細胞内への取り込みや合成が亢進していることが報告されている。また、12 員環ポリアミンの亜鉛錯体は DNA 中のチミジン(dT)を選択的に認識するため、含ホウ素大環状ポリアミン誘導体が細胞内で亜鉛錯体を形成し DNA と相互作用することで、中性子線照射で生じた重粒子線による DNA 損傷が効率的に引き起こされることが期待される。そこで申請者はボロン酸およびボロン酸エステルを有する 9~15 員環大環状ポリアミン誘導体を設計・合成し、がん細胞である HeLa S3 細胞と A549 細胞、正常細胞である IMR-90 細胞に対する細胞毒性や細胞内移行活性を評価した。そして、低毒性かつがん細胞選択的に取り込まれるホウ素化合物が見出された上、大環状ポリアミン誘導体がポリアミン輸送経路を介して取り込まれることが示唆された。さらに、選出した化合物の  $^{10}\text{B}$  濃縮体を用いて A549 細胞に対する

BNCT 活性を京都大学複合原子力科学研究所で評価した結果、比較対象化合物である BSH や BPA よりも高い殺細胞効果を示すことを明らかにした。これら大環状ポリアミン単量体は細胞内で亜鉛錯体を形成して DNA と相互作用することで、中性子線照射による DNA 損傷および細胞死誘導を引き起こすことが示唆された。これらの研究成果を *Journal of Medicinal Chemistry* で報告し、Supplementary Cover Art に採用された。

第 3 章では、より安全かつ有効なホウ素薬剤の創出を目指し、大環状ポリアミン二量体およびその亜鉛錯体を有するホウ素キャリアーの開発を行った。大環状ポリアミン二量体の二核亜鉛錯体は連続する 2 つの dT に対して単量体よりも強く相互作用することが報告されている。そのため、大環状ポリアミン二量体および対応する二核亜鉛錯体を有するホウ素キャリアーが DNA 近傍に  $^{10}\text{B}$  原子を送達することで、低濃度で高い BNCT 効果を示すことが期待される。そこで申請者は大環状ポリアミンのホモおよびヘテロ二量体を合成し、二本鎖 DNA との相互作用や細胞毒性、細胞内取り込み活性を評価した。そして、これらの二量体や対応する二核亜鉛錯体が DNA と相互作用することや単量体よりも低毒性であることが明らかにした。また、 $^{10}\text{B}$  濃縮体を用いた BNCT 活性をコロニーフォーメーションアッセイで評価し、BPA と同程度の活性を示す化合物を見出した。一方で、大環状ポリアミン二量体は第 2 章で見出された単量体よりも BNCT 活性が低いことから、細胞内移行活性や生体分子との相互作用が原因であると示唆された。現在は新たな誘導体の合成および *in vitro* での活性評価を検討しており、今後は大環状ポリアミン単量体を用いた *in vivo* での毒性評価や体内動態評価、BNCT による抗腫瘍効果の評価も行う予定である。

これらの研究内容はこれまでの一般的なホウ素集積量を高める戦略とは異なり、DNA 近傍に  $^{10}\text{B}$  原子を局在させ DNA 損傷を効率的に与える戦略であることから、これまでに見出された高い BNCT 活性を示すホウ素化合物が見出されたと考えられる。従って本論文は、博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。