

博士学位論文

医薬品と抗体薬物複合体（ADC）の相互作用
に関する研究

清宮 啓介

東京薬科大学大学院薬学研究科

A Study on Drug-ADC (Antibody-Drug Conjugates)
Interactions

Keisuke Kiyomiya

Ph.D. Thesis

Tokyo University of pharmacy and Life Sciences

目次

略語一覧	4
序論	5
第 1.1 節 KPL-4 細胞に対する T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響	13
第 1.2 節 HCC1954 細胞に対する T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす azithromycin の影響	16
第 1.3 節 DM1 の殺細胞効果に及ぼす azithromycin の影響	17
第 1.4 節 Trastuzumab deruxtecan の殺細胞効果に及ぼす azithromycin の影響	18
第 1.5 節 考察	19
第 1.6 節 小括	20
第 2 章 SLC46A3 輸送機能阻害の検討	21
第 2.1 節 SLC46A3 輸送活性に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響	22
第 2.2 節 Clarithromycin による SLC46A3 の輸送阻害の速度論的解析	24
第 2.3 節 Macrolide・ketolide 系抗菌薬のリソソーム集積性の評価とリソソーム内濃度の推定	25
第 2.4 節 リソソームにおける T-DM1 分解に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響	28
第 2.5 節 考察	29
第 2.6 節 小括	31
第 3 章 リソソーム指向性薬物が T-DM1 の殺細胞効果に与える影響	32
第 3.1 節 T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす amiodarone の影響	33
第 3.2 節 T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす tamoxifen の影響	34
第 3.3 節 T-DM1 の殺細胞効果および SLC46A3 に及ぼす proton pump inhibitors (PPIs) の影響	35
第 3.4 節 考察	37
総括	38
実験材料	40
実験方法	42
掲載論文	45
謝辞	46
引用文献	47

略語一覽

略語	名称
ADC	Antibody-drug conjugate
BafA	Bafilomycin A1
5-CF	5-Carboxyfluorescein
DM1	<i>N</i> ^{2'} -Deacetyl- <i>N</i> ^{2'} -(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine
FBS	Fetal bovine serum
HBSS	Hank's balanced salt solution
HER2	Human epidermal growth factor receptor type2
Lys-SMCC-DM1	Lysine- <i>N</i> ^ε - <i>N</i> -succinimidyl 4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate-DM1
MDCK	Mardin-Darby canine kidney
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PPI	Proton pump inhibitor
SMCC	<i>N</i> -Succinimidyl 4-(<i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate
T-DM1	Trastuzumab emtansine
T-DXd	Trastuzumab deruxtecan

序論

複数の医薬品の併用において、一方あるいは両方の医薬品の薬理効果が増強あるいは減弱することがある。このような現象は、薬物相互作用と呼ばれ、治療の失敗や重篤な有害事象の発生のリスクを高めるため、最適な薬物治療の実践においては薬物相互作用を予測し、事前に回避することが望まれる。

薬物相互作用は、その発現機構により、受容体への作用が変化する薬力学的相互作用と薬物の血中濃度が増減する薬物動態学的相互作用に大別される¹⁾。

薬力学的相互作用は、互いの薬物血中濃度へは影響を与えないが、受容体への作用が相加的もしくは相乗的に作用し、生体側の反応性が変化的ことで有害事象が発現し、拮抗作用を示す場合は効果を減弱させる。これらは薬物の薬理作用が同一もしくは類似していることが既知であれば予測が可能である。

薬物動態学的相互作用は、薬物の血中濃度が増減することで有害事象の発現、効果の減弱が起こる作用であり、薬物の吸収、分布、代謝および排泄の各過程で起こり得る。吸収過程においては薬物同士の複合体形成や胃内 pH 上昇による薬物の溶解性の低下などによって引き起こされる相互作用などがある^{2) 3)}。分布においてはタンパク結合の置換、代謝過程においては主に肝臓や小腸に発現する代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) が関与する。代謝酵素が関わる相互作用のうち、73%は CYP によるとの報告もあり、その分子種は 1A2、2C9、2C19、2D6 および 3A4 など多岐に渡る⁴⁾。また、吸収、分布および排泄の各過程においてはトランスポーターを介した相互作用も重要である。薬物動態に関わるトランスポーター(薬物トランスポーター)は、主に小腸、肝臓および腎臓に発現しているため、それらの阻害剤となる薬物の併用により、基質となる薬物の血中濃度が増大あるいは減少することがある。薬物によっては代謝酵素、薬物トランスポーターの両方を阻害するものもあり、併用する薬物の組み合わせも限りがないことから、薬物相互作用の正確な予測を網羅的に評価するのは難しいのが現状である。

トランスポーターは輸送駆動力により ATP binding cassette (ABC) トランスポーターおよび Solute carrier (SLC) トランスポーターに大別され、いずれの分類も薬物トランスポーターを含む⁵⁾。ABC トランスポーターは ATP の加水分解エネルギーを駆動力とし、主に細胞内の輸送基質を細胞外へ排出する。その代表的な薬物トランスポーターとして P-glycoprotein (P-gp/ABCB1)、breast cancer resistant protein (BCRP/ABCG2) が挙げられる⁶⁾。一方、SLC トランスポーターはイオンや基質の電気化学的ポテンシャル差に依存した基質輸送を担っており、薬物トランスポーターとしては organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs)、SLC22A ファミリーに属する organic anion transporters (OATs) および organic cation transporters (OCTs) が該当する^{7) 8)}。SLC トラン

スポーターには multidrug and toxin extrusion (MATE1,2-K/SLC47A1,2)のようにプロトンを駆動力として細胞内から細胞外への薬物排出を担っているものもある。

現状、医薬品開発においては、医薬品候補化合物の薬物動態学的相互作用のリスクを低減するために、非臨床試験の段階から相互作用を受ける側もしくは相互作用を与える側の両面から、ヒト組織や代謝酵素・トランスポーター発現系を用いた *in vitro* 試験が実施されている。また、第 I 相試験では、ヒトを対象とした血中濃度、代謝排泄経路および半減期を含む様々な薬物動態情報を収集・評価し、相互作用リスクが一定閾値を超えた場合には、必要に応じて臨床評価やモデリング&シミュレーションを実施し、その結果から薬物相互作用の定量的予測が行われている⁹⁾。

一方、近年は創薬モダリティの多様化、発展に伴い、新規モダリティを活用した医薬品が数多く開発され、臨床応用されている¹⁰⁾。例えば、新型コロナウイルス感染症に対する mRNA ワクチン、抗体医薬を活用した抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC)、脊髄性筋萎縮症に対する治療薬である核酸医薬品や遺伝子治療薬などがその例に挙げられる^{11) 12) 13)}。これら新たな医薬品群は、従来の低分子化合物を主体とする低分子医薬とは異なる作用機構や創薬標的に基づき効果を発揮するため、新たな治療の選択肢として注目を集めている。しかし、薬物動態の観点においては、モダリティに対応した体内動態を考慮する必要があるが、これらの体内動態を制御する分子機構に不明な点が多く、従来の低分子創薬で行われてきた薬物相互作用の系統的な検討はなされていない。

ADC は、癌細胞を標的とする抗体医薬 (IgG モノクローナル抗体) に、リンカーを介してペイロードと呼ばれる強力な殺細胞性化合物を結合させた抗悪性腫瘍薬であり、標的癌細胞特異的に作用するドラッグデリバリーシステムを活用したターゲティング医薬品である。ADC の概念は 1900 年代初頭、Paul Ehrlich によって考案され¹⁴⁾、近年の抗体医薬品の技術進歩と化学合成技術の融合によって有効性が高い ADC の開発が可能となり、現在、様々な ADC が臨床応用されている。2000 年、再発急性骨髄性白血病を適応とした gemtuzumab ozogamicin が ADC として初めて米国で承認されると、2011 年には再発ホジキンリンパ腫に対して brentuximab vedotin、2013 年には HER2 陽性進行再発乳癌に対して trastuzumab emtansine (T-DM1) が承認された¹⁵⁾。2023 年現在、米国では 11 種類 (11 種類中 6 種類のペイロードは微小管重合阻害剤)、日本では 7 種類 (7 種類中 4 種類のペイロードは微小管重合阻害剤) の ADC が使用されている (Table 1)。ADC の作用機序は、1) 癌細胞の標的抗原を特異的に認識、2) エンドサイトーシスによる細胞内への内在化、3) 早期エンドソームへの移行、4) リソソームへの移行 (一部は FcRn 受容体を介したリサイクリング機構によりリソソームへの移行を回避し、細胞外へ排出)、5) リソソーム酵素による分解、6) ペイロード

の細胞質移行、7) 殺細胞効果の発揮に大別される¹⁶⁾。

リソソームは、タンパク質分解酵素を豊富に含む酸性環境 (pH 4.5–5.0 付近) の細胞内小器官であり、細胞内の不要物や細胞外異物の消化・分解に関与する¹⁷⁾。リソソームへ移行した ADC は異物としてリソソームによる分解を受けるが、その分解生成物の細胞内動態は ADC のリンカーの種類によって異なる。リソソーム酵素であるカテプシンや酸性 (低 pH) に反応して切断されるリンカー (切断型リンカー) を有する ADC はリソソーム内でペイロードを遊離する一方、リソソーム内で安定なリンカー (非切断型リンカー) を有する ADC は、モノクローナル抗体部分のみがリソソーム酵素によって分解され、リンカーとその結合部位のアミノ酸を含むペイロードを遊離する¹⁸⁾。代表的な切断型リンカーとして valine/citrulline リンカーが挙げられ、brentuximab vedotin、polatuzumab vedotin、enfortumab vedotin および tisotumab vedotin に利用されている¹⁹⁾。非切断型リンカーとしては thioether 型リンカーおよび maleimidocaproyl リンカーが T-DM1 および belantamab mafodotin にそれぞれ使用されている¹⁹⁾。切断型リンカー型の ADC から遊離したペイロードはリソソーム膜を透過し、細胞質へ移行したペイロードが殺細胞効果を発揮する。さらには、標的細胞において薬効を発揮したペイロードは細胞膜を通過し、近傍細胞への殺細胞効果を発揮するとされている (bystander effect)²⁰⁾。一方、非切断型リンカー型の ADC から遊離した生成物は分子量の大きさおよび脂溶性の低さから生体膜を容易には通過できないため、そのリソソームから細胞質への移行に伴う分子機構については不明な点が多い²¹⁾。

非切断型リンカー型 ADC である T-DM1 はリソソーム内で IgG である trastuzumab が分解されたのち、活性代謝物である lysine-*N*^ε-*N*-succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate-DM1 (Lys-SMCC-DM1) を遊離する (Figure 1)。Lys-SMCC-DM1 の分子サイズは大きく (分子量: 1,104)、その pH 5.0 における人工膜透過性は低い (膜透過係数 $< 0.1 \times 10^{-6}$ cm/s) ため、リソソーム膜を介したリソソーム内から細胞質への移行には何らかの分子機構の関与が想定されていた。本背景のもと、T-DM1 の薬効や耐性に関わる網羅的な遺伝子探索が行われ、リソソーム膜トランスポーターをコードする SLC46A3 が同定された²¹⁾。SLC46A3 は葉酸トランスポーターである SLC46A1 と相同性を有し、ヒトにおいては小腸や肝臓に高発現することが示されていたが、そのトランスポーターとしての機能は不明であった²²⁾。

T-DM1 の耐性機構として、HER2 発現量の低下、p95 HER2 (切断型 HER2) の増加および T-DM1 のリサイクル機構の亢進などによる T-DM1 の標的細胞における異化作用の低下が知られているが、それらに加え、近年では T-DM1 のリソソームでの分解低下や SLC46A3 の発現低下の影響も報告されている²³⁾ ²⁴⁾。さらに、SLC46A3 の mRNA 発現が T-DM1 の効果予測バイオマーカーとなるとの

報告もある²⁵⁾。これらのことから、SLC46A3の機能低下はT-DM1の薬効に影響を及ぼすことが示唆されている。

最近、当研究室の研究において、SLC46A3はプロトン依存的な有機アニオントランスポーターであることが同定され、Lys-SMCC-DM1を良好な基質として輸送することが示された²⁶⁾。さらに、リソソーム指向性を有する代表的な薬物のなかで、clarithromycin、erythromycinおよびrifabutinは、SLC46A3を介したLys-SMCC-DM1の輸送を阻害し、T-DM1の薬効を低下させることが明らかとなった²⁶⁾。

以上の知見より、T-DM1を用いた治療において、SLC46A3輸送機能を阻害する医薬品の併用はT-DM1の薬効を減弱させる可能性を示唆している。このT-DM1の薬効低下は抗癌剤治療の失敗に繋がり、患者不利益に直結する。T-DM1は2019年、早期乳癌の術後薬物療法にも適応を拡大し、現在でも広く使用されている²⁷⁾。Erythromycinおよびclarithromycinを含むmacrolide系抗菌薬は臨床における主要な抗菌薬であり、ざ瘡、副鼻腔炎および扁桃炎等の一般感染症に対して繁用されている。しかし、T-DM1の薬理効果およびSLC46A3の輸送機能に及ぼす他のmacrolide系抗菌薬、リソソーム指向性を持つ薬物、あるいはリソソーム酵素に影響を与える薬物の影響は明らかになっていない。そこで本研究では、医薬品とADCの相互作用の重要性を探るため、T-DM1の薬効へ影響を及ぼす各種薬物の影響を検討することを目的とした。

第1章では、代表的なリソソーム指向性を持つ薬物であるmacrolide・ketolide系抗菌薬に着目し、T-DM1の薬効に及ぼす影響について検討した。第2章では、macrolide・ketolide系抗菌薬のSLC46A3輸送活性に与える影響を検討した。第3章では、臨床で使用されるリソソーム指向性薬物がT-DM1の殺細胞効果に及ぼす影響について検討した。

Table 1. ADCs approved in the U.S. and Japan

成分名	商品名	化合物	リンカー	標的	適応
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Calicheamicin	Hydrazone (低pH依存型)	CD33	AML
Brentuximab vedotin	Adcetris	MMAE	mc-Val-Cit-PABC	CD30	CD30陽性 ホジキンリンパ腫等
Trastuzumab emtansine (T-DM1)	Kadcyla	DM1	SMCC (非切断型)	HER2	HER2陽性転移性乳癌
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa	calicheamicin	Hydrazone (低pH依存型)	CD22	CD22陽性B細胞前駆体急性 リンパ芽球性白血病
Polatuzumab vedotin	Polivy	MMAE	mc-Val-Cit-PABC	CD79	DLBCL
Enfortumab vedotin	Padcev	MMAE	mc-Val-Cit-PABC	Nectin-4	尿路上皮癌
Trastuzumab deruxtecan (T-DXd)	Enhertu	DXd	mc-Gly-Gly-Phe-Gly	HER2	転移性HER2陽性乳癌/ 胃癌/肺癌
Sacituzumab govitecan	Trodelyv (国内未承認)	SN-38	Carbonate (低pH依存型)	Trop-2	トリプルネガティブ乳癌
Belantamab mafodotin (2022年 FDA 承認取下げ)	Blenrep (国内未承認)	MMAF	mc (非切断型)	BCMA	MDS
Loncastuximab tesirine	Zynlonta (国内未承認)	SG3199 Pyrrolobenzodiazepine	dPEG8-Val-Ala	CD19	DLBCL
Tisotumab vedotin	TIVDAK (国内未承認)	MMAE	mc-Val-Cit-PABC	Tissue Factor	子宮頸癌
Mirvetuximab soravtansine	Elahere (国内未承認)	DM4	Disulfide	FR α	卵巣癌

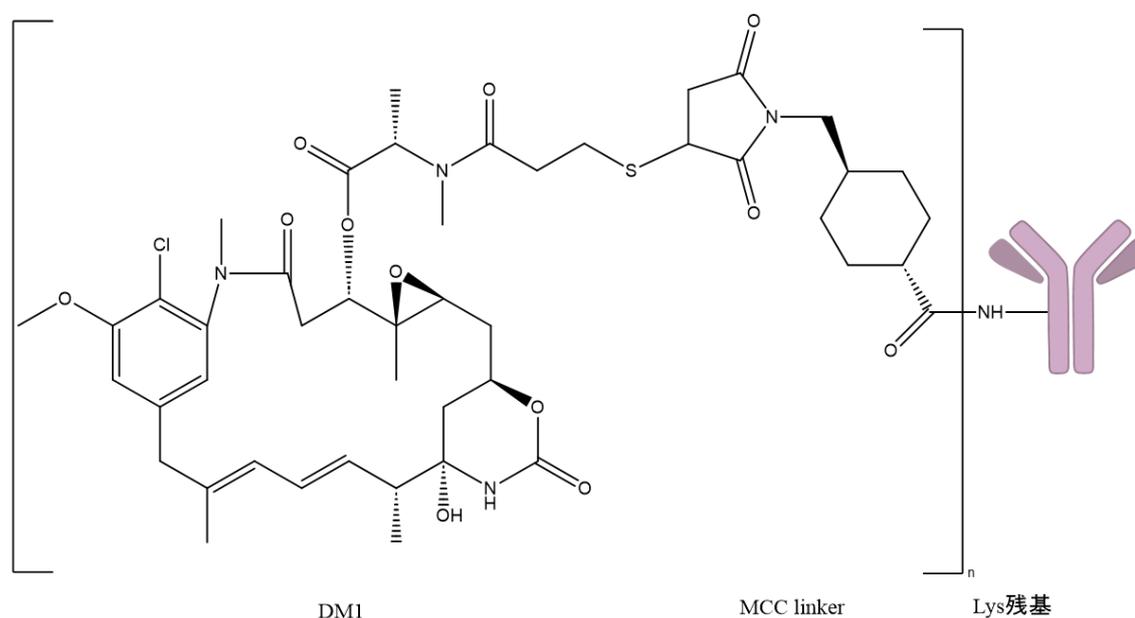


Figure 1. Structure of T-DM1

第1章 T-DM1 の薬効に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響

Macrolide 系抗菌薬は、グラム陽性球菌、マイコプラズマおよびクラミジアに感受性を有しており、主に呼吸器感染症に対して汎用されている²⁸⁾。Macrolide 系抗菌薬は1950年代に erythromycin が発見されて以降、その誘導体が数多く開発されてきた。1990年代に clarithromycin、azithromycin が上市され²⁹⁾、2000年代に入ると、分子内に環状カルバメート基を有し、macrolide 系抗菌薬よりも広い抗菌スペクトルを有する ketolide 系抗菌薬が開発され、国内では telithromycin が発売された³⁰⁾。しかし、telithromycin は意識消失や肝炎の副作用が問題となり、2012年、日本の市場から撤退した³¹⁾。現在、新規 ketolide 系抗菌薬として solithromycin の臨床開発が進行中である。2018年のWHOの調査によると、macrolide 系抗菌薬は世界中で使用されており、 β -lactam 系抗菌薬の次に多い処方量となっている³²⁾。また、macrolide 系抗菌薬は、抗菌作用以外にも、インターフェロン、インターロイキンの産生抑制作用、好中球機能および遊走能抑制作用を有し、慢性副鼻腔炎³³⁾、びまん性汎細気管支炎³⁴⁾、気管支拡張症³⁵⁾および非結核性抗酸菌症³⁶⁾に対して抗炎症作用や免疫調節作用を有している。

Macrolide・ketolide 系抗菌薬の体内動態特性としては、一般的に大きな分布容積を示し、細胞内移行性に優れていることが挙げられる³⁷⁾。特にマクロファージをはじめとする食細胞や炎症組織細胞に良好に移行し、多くはリソソームを含む細胞内の酸性小胞に移行することが知られている。したがって、リケッチアやクラミジアなどの細胞内小胞を介して増殖する細胞内寄生菌に対して macrolide・ketolide 系抗菌薬は有効である³⁸⁾。

Macrolide・ketolide 系抗菌薬は大環状ラクトンの基本骨格とし、その構造から主に14、15、16員環に分類される (Figure 2)。いずれも3位に L-cladinose、5位に D-desosamine がグリコシド結合をした配糖体となっている (ketolide は3位がケトン体に置換)。14員環として erythromycin、clarithromycin および roxithromycin、15員環として azithromycin、16員環として josamycin、ketolide 系として telithromycin が主な医薬品として開発され、現在、主に14員環と15員環の macrolide が臨床において使用されている。

Macrolide 系抗菌薬は他の薬物との併用により薬物相互作用を引き起こすことがある。特に14員環の erythromycin や clarithromycin は強い CYP3A4 阻害作用を有し³⁹⁾、CYP3A4 の基質となる薬物の血中濃度を上昇させ、薬効を増強する。また、一部の薬物トランスポーターに対する阻害作用も有し、P-gp⁴⁰⁾、OATP1B1 および OATP1B3 に対する阻害が知られている⁴¹⁾。一方、15員環の azithromycin は、弱い P-gp 阻害作用を有するものの、14員環で認められる CYP 阻害作用や薬物トランスポーターに対する阻害作用はほとんどなく、相互作用の

頻度は14員環と比較して少ないという特徴を有している^{42) 43) 44) 45) 46)}。そこで第1章では細胞内移行に優れた macrolide・ketolide系抗菌薬がADCの薬効に及ぼす影響を検討した。

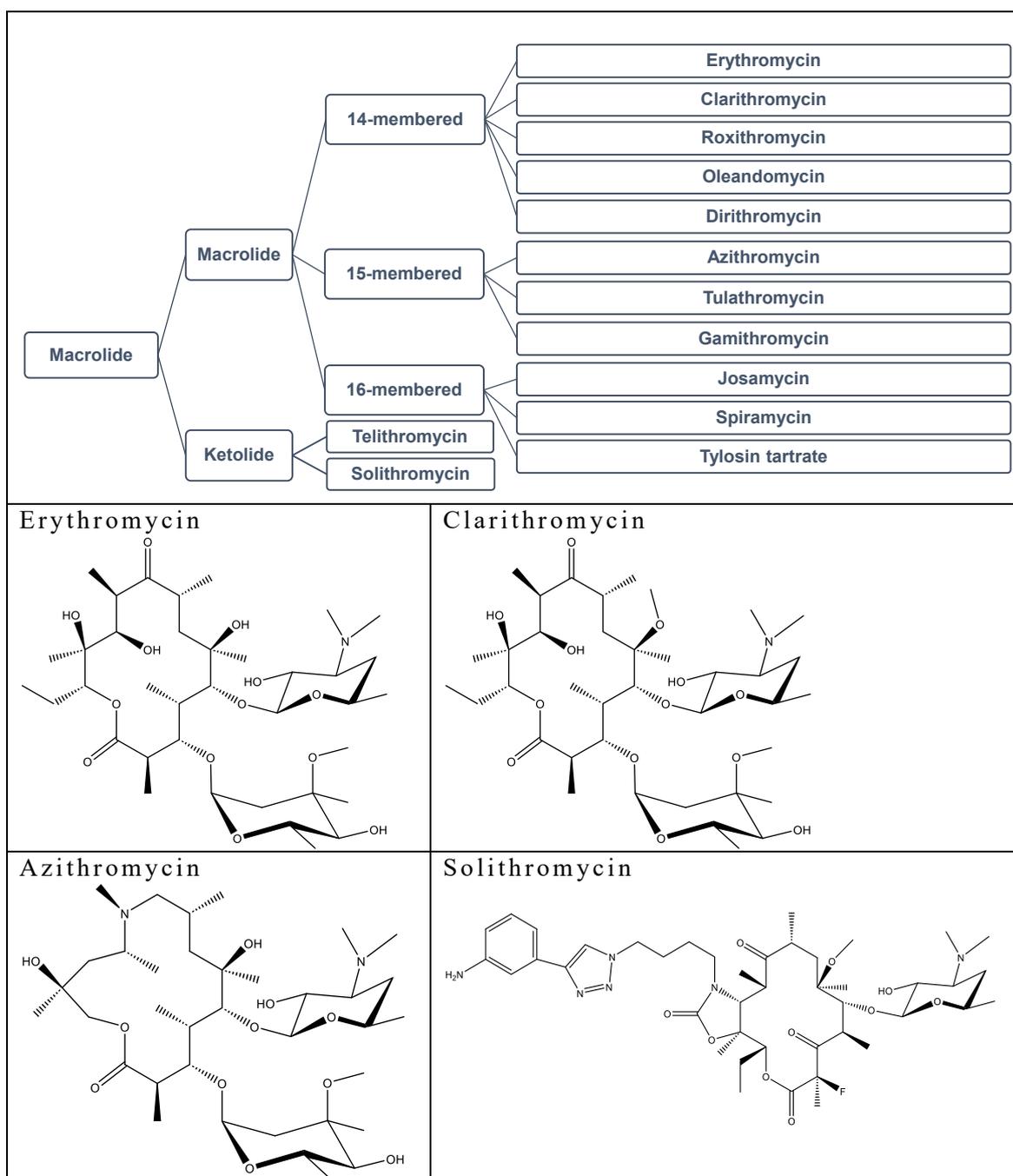


Figure 2. Classification of macrolides and ketolides based on the lactone ring structure (upper), and chemical structures of the representatives (lower).

第 1.1 節 KPL-4 細胞に対する T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響

ADC の殺細胞効果に及ぼす macrolide 系抗菌薬の影響を明らかにするために、HER2 陽性乳癌細胞である KPL-4 細胞を用いてその細胞生存率を評価した。

先だって、T-DM1 の曝露濃度を設定するため、KPL-4 細胞に対する T-DM1 の殺細胞効果について検討した結果、その LD₅₀ 値は 5.14 ng/mL と算出された (Figure 3)。続いて、臨床で使用されている macrolide 系抗菌薬として 14 員環の erythromycin、clarithromycin および roxithromycin、15 員環の azithromycin、16 員環の josamycin、また、現在臨床開発中である新規 ketolide 系抗菌薬 solithromycin も含め、計 6 薬物を選択し、T-DM1 (0.005, 0.01 µg/mL) 存在あるいは非存在下における各種 macrolide・ketolide 系抗菌薬 (0.1–30 µM) 曝露時の細胞生存率を測定した (Figure 4)。macrolide・ketolide 系抗菌薬の単独曝露は KPL-4 細胞の生存率に有意な影響を与えなかった。また、0.01 µg/mL の T-DM1 単独のコントロール条件では細胞生存率は 10% まで低下した。しかし、T-DM1 存在下に erythromycin、clarithromycin、roxithromycin、azithromycin、josamycin および solithromycin をそれぞれ曝露した結果、濃度の増加に伴い細胞生存率の上昇が認められ、3 µM 曝露時における細胞生存率はそれぞれ 22 ± 2.4%、31 ± 3.2%、26 ± 3.1%、64 ± 2.8%、18 ± 2.8% および 24 ± 2.4% まで上昇した。特に T-DM1 と azithromycin 存在下においては azithromycin の濃度依存的に細胞生存率が顕著に上昇し、10 µM では T-DM1 非存在下と同等まで上昇した。

以上から、macrolide・ketolide 系抗菌薬は T-DM1 の殺細胞効果を減弱させ、特に azithromycin でその影響が大きいことが示された。

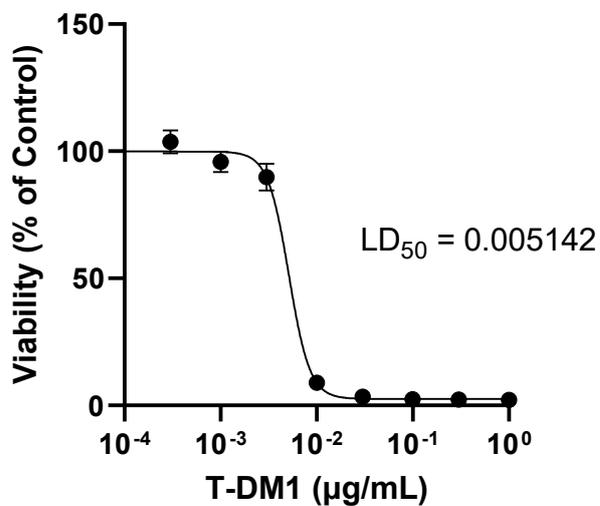


Figure 3. Calculation of the LD₅₀ value of T-DM1 in KPL-4 cells. Cells were exposed to indicated concentration of T-DM1 for 4 days (n = 9). Solid line is the computer-fitted profile. Data represent the mean ± SEM. Obtained from three biologically independent experiments.

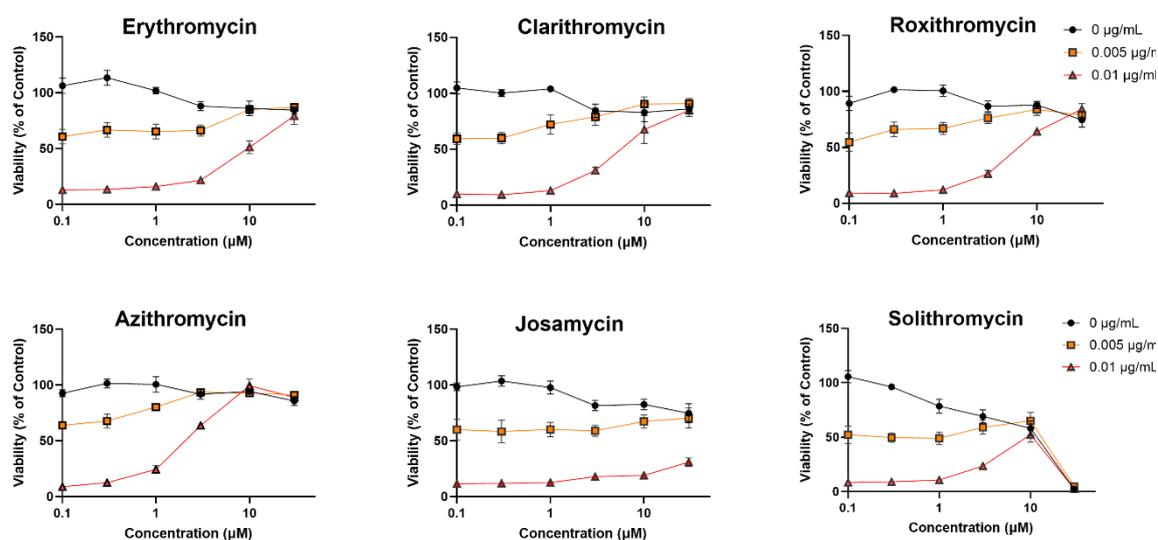


Figure 4. Macrolides and a ketolide counteract T-DM1 cytotoxicity in KPL-4 cells. Effect of macrolides and a ketolide on cell viability in the presence or absence of T-DM1. KPL-4 cells were exposed to T-DM1 (0 µg/mL, black; 0.005 µg/mL, yellow; 0.01 µg/mL, red) for 96 h with test drugs at the indicated concentration. Data are presented as means ± SEM (n = 4–6) obtained from two biologically independent experiments.

第 1.2 節 HCC1954 細胞に対する T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす azithromycin の影響

KPL-4 細胞を用いた検討において、azithromycin による顕著な T-DM1 の薬効減弱効果が認められた。この効果を他の細胞株で確認するため、HER2 陽性乳癌細胞である HCC1954 細胞を用いて同様の検討を行った(Figure 5)。

0.01、0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の T-DM1 存在下における細胞生存率は、それぞれ 61%、40%であったが、azithromycin の添加により濃度依存的に T-DM1 の殺細胞効果を減弱し、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の T-DM1 存在下の細胞生存率は、3 μM の azithromycin により、それぞれコントロールの $94 \pm 1.9\%$ 、 $81 \pm 8.5\%$ まで上昇した。

この結果より、KPL-4 細胞で認められた azithromycin による T-DM1 の薬効減弱効果が HCC1954 細胞においても確認された。

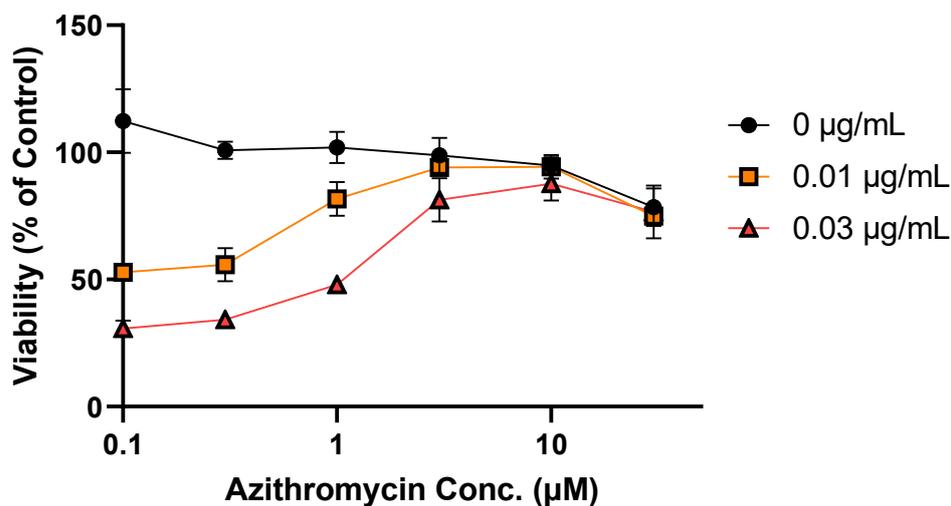


Figure 5. Azithromycin counteract T-DM1 cytotoxicity in HCC1954 cells. Effect of azithromycin on cell viability in the presence or absence of T-DM1. HCC1954 cells were exposed to T-DM1 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, black; 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, yellow; 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, red) for 96 h with test drugs at the indicated concentration. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$) obtained from two biologically independent experiments.

第 1.3 節 DM1 の殺細胞効果に及ぼす azithromycin の影響

DM1 は、分子量 738.3 の微小管重合阻害薬であり、T-DM1 にペイロードとして搭載されている⁴⁷⁾。前述のとおり、T-DM1 は非切断型リンカーを利用しているため、リソソーム内においてはリンカーが DM1 と結合した状態、すなわち Lys-SMCC-DM1 として遊離される。しかし、T-DM1 を投与した患者において、一部は DM1 として遊離され、血中に検出されることが知られている⁴⁸⁾。そこで、azithromycin による T-DM1 の薬効減弱効果が DM1 の殺細胞効果に影響したものであるかどうかを検討するため、azithromycin 存在下における DM1 の殺細胞効果を評価した(Figure 6)。

HCC1954 細胞に対する DM1 の LD₅₀ 値は 2.36 nM と算出されたため、DM1 の濃度を 0 nM、3 nM および 10 nM に設定した。3 nM、10 nM DM1 曝露時における細胞生存率はコントロールと比較し、それぞれ 50%、40%となり、azithromycin 共存下 (0.1–30 μM) において細胞生存率の有意な変化は認められなかった。

したがって、azithromycin は DM1 の殺細胞効果に影響を与えないことが示された。

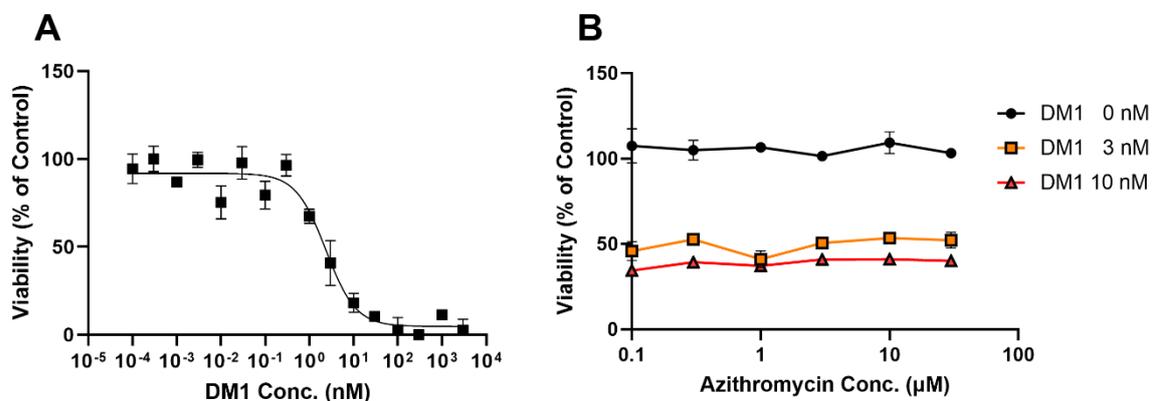


Figure 6. The effect of DM1 on HCC1954 cells. (A) Calculation of the LD₅₀ value of DM1 in HCC1954 cells. Cells were exposed to indicated concentration of DM1 for 2 days (n = 2). Solid line is the computer-fitted profile. Data represent the mean ± SEM.

(B) Azithromycin did not counteract DM1 cytotoxicity in HCC1954 cells. Effect of azithromycin on cell viability in the presence or absence of DM1. HCC1954 cells were exposed to DM1 (0 nM, black; 3 nM, yellow; 10 nM, red) for 2 days with test drugs at the indicated concentration. Data are presented as means ± SEM (n = 4) obtained from two biologically independent experiments.

第 1.4 節 Trastuzumab deruxtecan の殺細胞効果に及ぼす azithromycin の影響

Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) は HER2 陽性乳癌、胃癌および非小細胞肺癌に適応を持つ切断型リンカー型の ADC である⁴⁹⁾。T-DXd の抗体部分は T-DM1 と同じ trastuzumab であるが、ペイロードはトポイソメラーゼ I 阻害作用を有する exatecan 誘導体である deruxtecan が用いられている²⁰⁾。Macrolide・ketolide 抗菌薬が T-DM1 以外の ADC の殺細胞効果も減弱させるのかを確認するために、T-DXd の殺細胞効果に対する azithromycin の影響について検討した (Figure 7)。

T-DXd の KPL-4 細胞に対する殺細胞効果は T-DM1 による効果に比べて弱く、高濃度存在下における生存率を最低値としたときの LD₅₀ 値は 0.049 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。0.2、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ T-DXd 存在下における細胞生存率は azithromycin 濃度依存的な添加による変動を認めなかった。

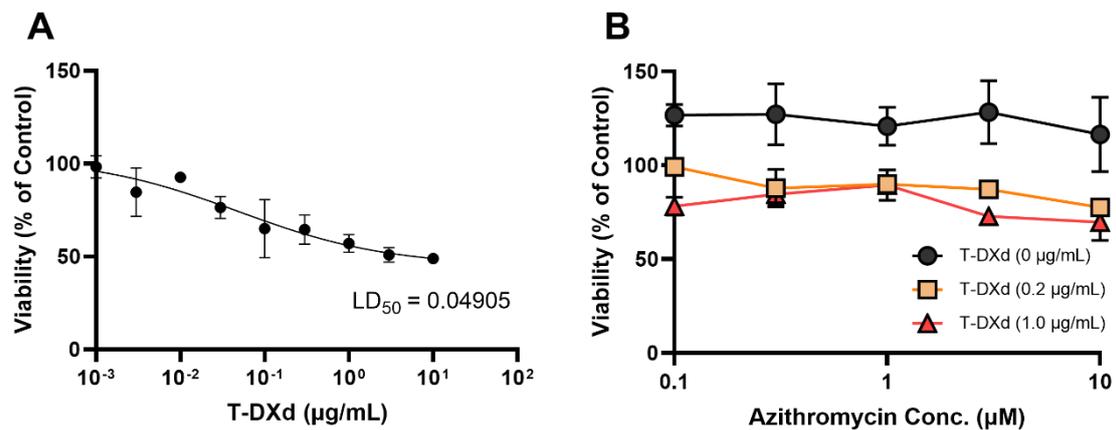


Figure 7. The effect of T-DXd on KPL-4 cells. (A) Calculation of the LD₅₀ value of T-DXd in KPL-4 cells. Cells were exposed to indicated concentration of T-DXd for 6 days ($n = 2$). Solid line is the computer-fitted profile. Data represent the mean \pm SEM.

(B) Azithromycin did not counteract T-DXd cytotoxicity in KPL-4 cells. Effect of azithromycin on cell viability in the presence or absence of T-DXd. KPL-4 cells were exposed to T-DXd (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, black; 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, yellow; 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, red) for 6 days with test drugs at the indicated concentration. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$) obtained from two biologically independent experiments.

第 1.5 節 考察

Macrolide・ketolide 系抗菌薬は HER2 陽性乳癌細胞 KPL-4 細胞における T-DM1 の殺細胞効果を用量依存的に減弱させた。この結果は当研究室でこれまでに報告した erythromycin および clarithromycin を用いた他の HER2 陽性乳癌細胞である SK-BR-3 細胞および HCC1954 細胞に対する結果²⁶⁾と一致する。また本研究において、azithromycin が T-DM1 の殺細胞効果を顕著に減弱することを見出した。これらのことは、T-DM1 の殺細胞効果の減弱に対する macrolide 系抗菌薬の影響が、macrolide の環状構造に依存せず、14 員環、15 員環、16 員環および ketolide 系に共通した作用であることを示している。

一方、azithromycin は T-DM1 の薬効を減弱するものの、DM1 の殺細胞効果に影響を示さなかった。DM1 は脂溶性が高く ($\log P = 5.0$)、細胞膜透過性が高いことから、細胞外に添加した DM1 は容易に細胞内に移行し、薬効標的部位である微小管に結合することで殺細胞効果を発揮すると考えられる。したがって、*in vitro* 試験による本結果は、azithromycin が細胞質において DM1 の微小管重合阻害活性に干渉しないことを示しており、azithromycin による T-DM1 の薬効減弱効果は DM1 自体の薬効に対する効果でないことが示唆された。

T-DXd を用いた検討において、azithromycin による T-DXd の殺細胞効果の減弱は認められなかった。T-DXd と T-DM1 は同じ IgG (trastuzumab) により標的化されるため、細胞における内在化やリソソームへの移行過程は同様であると考えられる。また、T-DXd は T-DM1 とは異なり切断型リンカーが用いられているが、その薬効発現においては T-DM1 と同様にリソソーム酵素による分解を受ける。したがって、azithromycin は T-DXd と T-DM1 の細胞内動態には影響を及ぼさず、リソソーム酵素に対する影響は小さいことが推察された。一方、T-DXd のペイロードである DXd は、分子量 494 と小さく、膜透過性は高いことが知られており、ペイロードの膜透過性に依存する bystander effect を示すことが報告されている²⁰⁾。そのため、リソソーム膜を介した細胞質への DXd の移行は単純拡散によるものと考えられている。したがって、azithromycin の影響が T-DXd と T-DM1 とで異なる要因は、薬効成分のリソソームから細胞質の移行過程にあることが示唆された。

以上の結果より、先行研究同様²⁶⁾、リソソーム指向性を持つ macrolide・ketolide 系抗菌薬が SLC46A3 トランスポーターを介した T-DM1 の活性代謝物 Lys-SMCC-DM1 の輸送に影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、macrolide・ketolide 系抗菌薬における SLC46A3 輸送機能に及ぼす影響は class effect ではなく drug effect である可能性も併せて示している。そのため、T-DM1 の薬効に及ぼす macrolide・ketolide 抗菌薬の影響をより詳細に第 2 章で検討することとした。

第 1.6 節 小括

第 1 章では、macrolide・ketolide 系抗菌薬が T-DM1 の薬効に与える影響を検討した。その結果、erythromycin および clarithromycin のみならず、14 員環 roxithromycin、15 員環 azithromycin、16 員環 josamycin および ketolide 系 solithromycin が T-DM1 の殺細胞効果を減弱させることを見出した。特に KPL-4 細胞に対する T-DM1 の殺細胞効果は、azithromycin により顕著に減弱し、3 μM の濃度においてコントロールの 64%まで細胞生存率を上昇させることを示した。この効果は KPL-4 細胞および HCC1954 細胞において同様であった。一方、azithromycin は DM1 および T-DXd の殺細胞効果に有意な影響を及ぼさなかった。

第 2 章 SLC46A3 輸送機能阻害の検討

SLC46A3 は 461 個のアミノ酸からなる 12 回膜貫通型のリソソーム膜トランスポーターである。SLC46A3 は小腸、肝臓をはじめ全身に分布しており、乳癌組織にも発現している⁵⁰⁾。SLC46A3 の生理的機能は不明であるが、これまでに肝臓における銅ホメオスタシスへの関与、肝臓がんの予後および tyrosine kinase 阻害薬 sorafenib の薬効との関連が示唆されている^{51) 52)}。

最近、当研究室において、SLC46A3 の輸送機能を同定し、SLC46A3 がリソソーム内から細胞質へプロトン依存的にステロイド抱合体および胆汁酸を輸送する有機アニオントランスポーターである可能性を提唱した²⁶⁾。また、SLC46A3 の輸送機能を評価するため、その C 末端領域に含まれるリソソーム移行性シグナルであるチロシンモチーフを欠如させ、SLC46A3 をリソソーム膜から細胞膜へ移行させた SLC46A3 dC を安定的に発現した MDCKII 細胞 (SLC46A3 dC 細胞) を樹立した。当該研究において、Lys-SMCC-DM1 の SLC46A3 を介した取り込みクリアランスは pH 7.4 の条件下と比較し、pH 5.0 のリソソーム内環境条件下では 5 倍大きかったことから、リソソームでの Lys-SMCC-DM1 の輸送は SLC46A3 を介していることが示唆されている。さらに、erythromycin、clarithromycin および rifabutin は Lys-SMCC-DM1 の取り込みを阻害した一方で、典型的なリソソーム阻害剤である chloroquine は Lys-SMCC-DM1 の取り込みを阻害しなかったことを報告している。加えて、SLC46A3 の輸送機能を簡便に測定できる蛍光プローブの探索から、5-carboxyfluorescein (5-CF) を同定し、SLC46A3 による 5-CF の輸送活性は pH 5.0 で最大となることを示した。また、その濃度依存的な取り込みは飽和性を示し、5-CF が SLC46A3 の良好な基質であることを見出している (K_m : 5.93 μ M)⁵³⁾。

このような背景から、第 2 章では、第 1 章で認められた macrolide・ketolide 系抗菌薬による T-DM1 の薬効減弱効果と SLC46A3 の輸送機能との関係性を探るため、SLC46A3 の輸送活性に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の効果を Lys-SMCC-DM1 と 5-CF を輸送基質として用いて評価した。

第 2.1 節 SLC46A3 輸送活性に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響

T-DM1 の活性代謝物である Lys-SMCC-DM1 の輸送に関与するとされる SLC46A3 の輸送活性に対する macrolide・ketolide 系抗菌薬の阻害効果の有無を確認するために SLC46A3 発現細胞における 5-CF の細胞内への取り込みに対する各種 macrolide・ketolide 系抗菌薬(erythromycin、clarithromycin、roxithromycin、azithromycin、josamycin および solithromycin)の効果を評価した(Figure 8A)。SLC46A3 による 5-CF の取り込みは、検討対象とした全ての macrolide・ketolide 系抗菌薬により顕著に阻害された。その IC₅₀ 値は、erythromycin (70.4 ± 1.4 μM)、clarithromycin (73.6 ± 1.3 μM)、roxithromycin (190 ± 4.7 μM)、azithromycin (514 ± 1.3 μM)、josamycin (63.7 ± 1.3 μM) および solithromycin (52.5 ± 1.2 μM) であった。特に azithromycin では高い IC₅₀ 値を示し、SLC46A3 の阻害能が低いことが示された。続いて、macrolide・ketolide 系抗菌薬の SLC46A3 機能阻害の影響を macrolide 環の化学構造に基づき包括的に検討するために、上記以外の環状構造の異なる macrolide・ketolide 系抗菌薬として、14 員環 (oleandomycin、dirithromycin)、15 員環 (gamithromycin、tulathromycin)、16 員環 (spiramycin、tylosin tartrate) および ketolide 系 (telithromycin) について 5-CF の取り込みに対する影響を評価した (Figure 8B)。各薬物 100 μM 存在下において、telithromycin を除き、SLC46A3 を介した 5-CF 輸送に対する有意な阻害は認められなかった。

さらに、SLC46A3 を介した Lys-SMCC-DM1 の輸送に対する azithromycin の阻害効果を確認した結果、azithromycin 1 mM の共存下において SLC46A3 を介した Lys-SMCC-DM1 の輸送は 36%に低下した (Figure 8C)。

以上より、臨床で使用されている主要な macrolide・ketolide 系抗菌薬は SLC46A3 輸送活性を阻害することが明らかとなった。一方、その阻害効果は macrolide・ketolide 系抗菌薬の環状構造には依存しないことが示された。

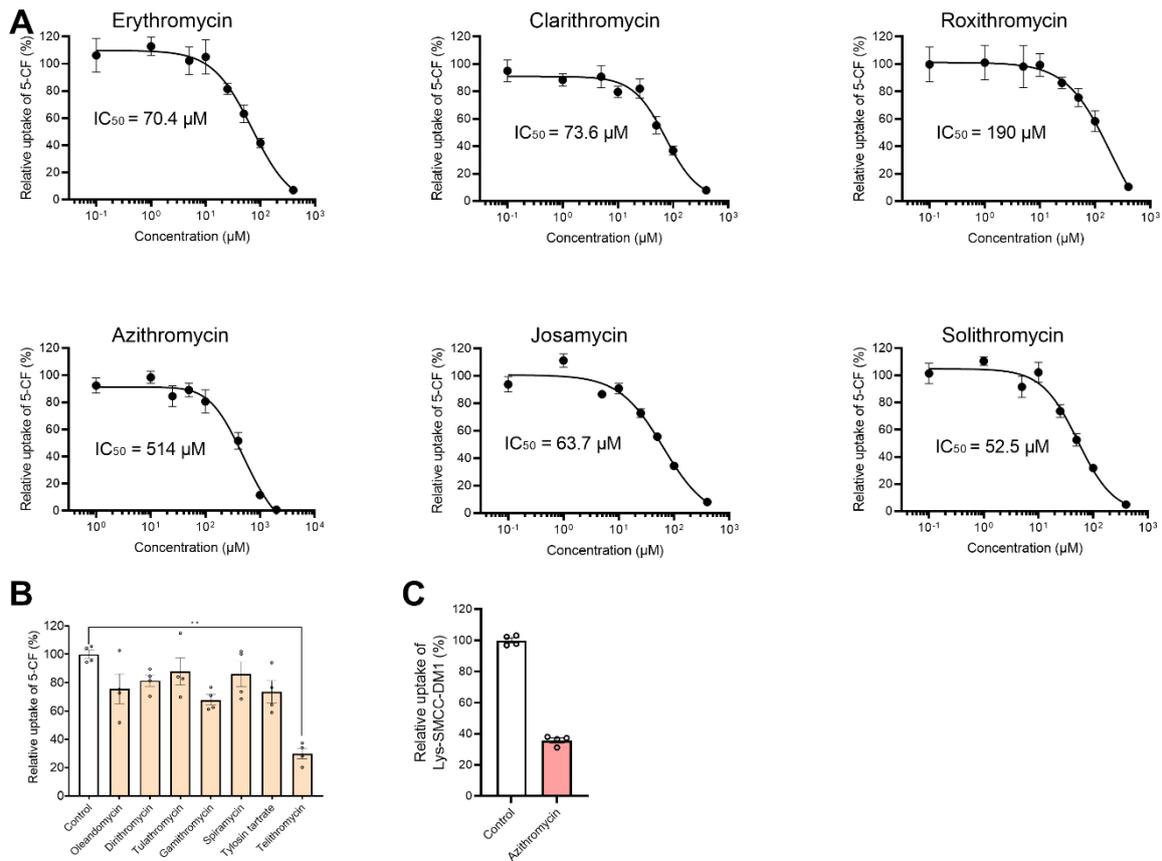


Figure 8. The effect of macrolides and ketolides on SLC46A3 transport activity. (A) Dose-dependent inhibition of SLC46A3-mediated 5-CF uptake by macrolides and a ketolide. Uptake of 5-CF ($2 \mu\text{M}$) in SLC46A3 dC/Mock cells was measured at pH 5.0 for 5 min in the presence of the indicated compounds ($1\text{--}2000 \mu\text{M}$ for azithromycin; $0.1\text{--}400 \mu\text{M}$ for the other compounds). Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 4\text{--}6$) obtained from two biologically independent experiments. The solid line represents the computer-fitted profile. (B) SLC46A3-mediated 5-CF uptake was evaluated at pH 5.0 in the presence or absence of macrolides and a ketolide ($100 \mu\text{M}$). Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 4$) obtained from two biologically independent experiments (**: $P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test). (C) SLC46A3-mediated Lys-SMCC-DM1 ($5 \mu\text{M}$) uptake was evaluated at pH 5.0 in the presence or absence of 1 mM azithromycin. Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 4$) obtained from two biologically independent experiments. Relative uptake is shown as a percentage of uptake without inhibitors (control) in SLC46A3 dC cells subtracted by that in mock cells.

第 2.2 節 Clarithromycin による SLC46A3 の輸送阻害の速度論的解析

Macrolide・ketolide 系抗菌薬が SLC46A3 輸送機能を阻害するメカニズムを探索するため、SLC46A3 dC 細胞を用いて SLC46A3 介在性 5-CF 輸送に対する clarithromycin (50 μM 、100 μM) の阻害効果を速度論的に解析した (Figure 9, Table 3)。Clarithromycin 存在下において最大輸送速度 (V_{max}) は大きく変化しなかったが、5-CF との親和性を示す K_m 値は濃度依存的に上昇した。以上の結果から clarithromycin による SLC46A3 輸送機能の阻害メカニズムは競合阻害である可能性が示された。

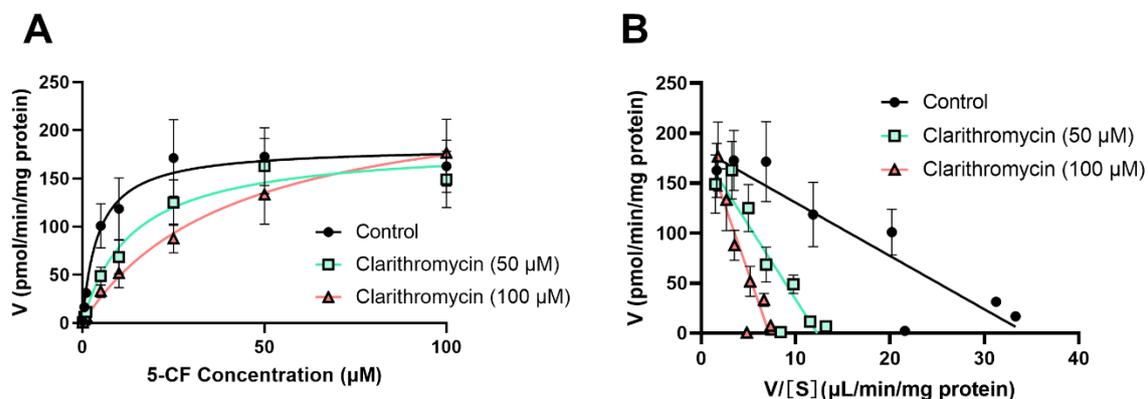


Figure 9. Mode of inhibition of clarithromycin regarding SLC46A3 dC-mediated 5-CF uptake. Concentration-dependent 5-CF uptake (0.1–100 μM) was evaluated for 5 min at pH 5.0 in the absence or presence of clarithromycin. The solid line represents the computer-fitted profile. (A) Michaelis–Menten. (B) Eadie–Hofstee plot.

Table 3. Kinetic parameters of 5-CF uptake mediated by SLC46A3 dC in the absence or presence of clarithromycin

	Control	Clarithromycin	
		50 (μM)	100 (μM)
V_{max} (pmol/min/mg protein)	183.8 ± 16.1	182.1 ± 16.2	196.5 ± 20.0
K_m (μM)	5.33 ± 0.81	14.8 ± 1.94	27.3 ± 3.76

K_m and V_{max} were obtained by simple linear regression.

第 2.3 節 Macrolide・ketolide 系抗菌薬のリソソーム集積性の評価とリソソーム内濃度の推定

第 2.1 節において SLC46A3 の輸送機能を阻害する macrolide・ketolide 系抗菌薬の IC₅₀ 値は 50–500 μM を示したにもかかわらず、第 1.1 節において macrolide・ketolide 系抗菌薬は 3 μM の濃度にて T-DM1 の薬効を減弱させた。この矛盾を解明すべく、第 2.3 節では macrolide・ketolide 系抗菌薬のリソソーム集積性の評価とリソソーム内濃度の推定を試みた。まず、リソソーム阻害剤 (V-ATPase inhibitor) である bafilomycin A1 (Baf A) 存在下・非存在下における各 macrolide・ketolide 抗菌薬の細胞内蓄積量を Figure 10 に示す。いずれの macrolide・ketolide 系抗菌薬も Baf A 存在下において有意に細胞内濃度が低下したことから、細胞内の macrolide・ketolide 系抗菌薬の多くはリソソーム内に蓄積していることが示された。Baf A 非存在下での細胞内蓄積量から BafA 存在下での細胞内蓄積量を差し引いた各薬物の蓄積量 (pmol/mg protein) は erythromycin (27.6 ± 4.6)、clarithromycin (280 ± 20)、roxithromycin (90.8 ± 4.5)、azithromycin (1.13 × 10³ ± 1.1 × 10²)、josamycin (27.5 ± 5.1) および solithromycin (348 ± 56) であった。リソソームへの集積性を評価するために、BafA 存在下での細胞内蓄積量に対する Baf A 非存在下での細胞内蓄積量の比を算出したところ、azithromycin で顕著に高く、その値は 57 倍であった (Figure 10B)。

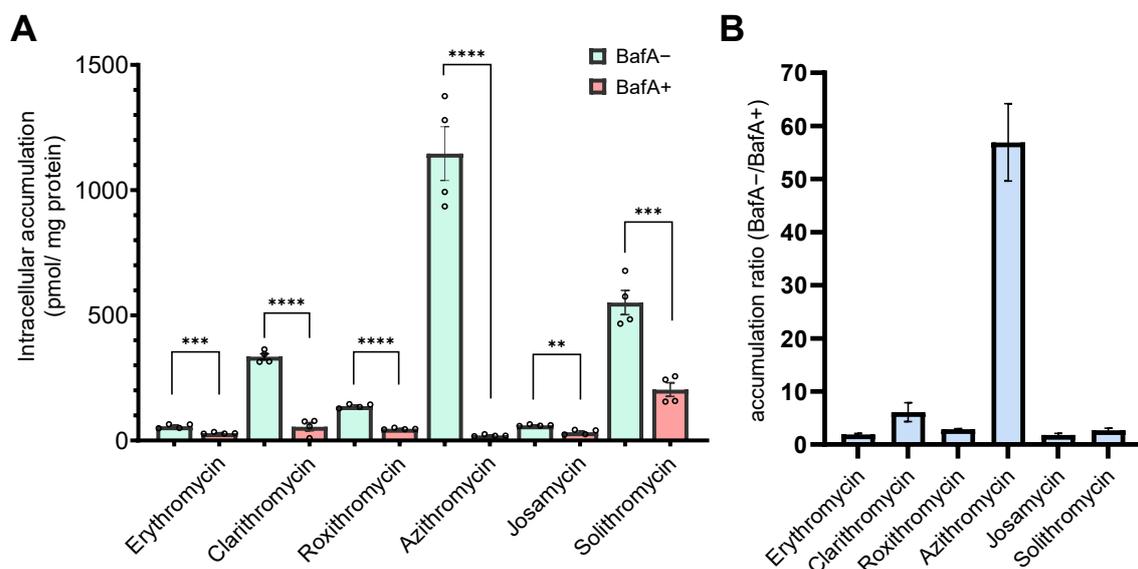


Figure 10. Accumulation of macrolides and a ketolide in lysosomes. (A) KPL-4 cells were incubated with the indicated macrolides and a ketolide (2 μM) for 24 h in the presence or absence of 100 nM bafilomycin A1 (BafA). The intracellular amounts of macrolides and a ketolide were determined by LC-MS/MS. Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 4$) obtained from two biologically independent experiments (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$, two-tailed unpaired t test). (B) The accumulation ratio was calculated by dividing each intracellular amount of macrolides or a ketolide by that in the presence of BafA.

続いて、macrolide・ketolide系抗菌薬のリソソーム内濃度の推定を試みた。細胞体積は通常 $1,000 \mu\text{m}^3/\text{cell}$ であり、リソソーム体積は細胞体積の約 0.5–5% と見積もられる^{54) 55)}。リソソーム内濃度の推定にあたり、リソソーム体積を過少に見積もることはリソソーム内濃度を過大に評価することに繋がる恐れや、リソソーム指向性を持つ imipramine 投与によりリソソーム体積は 4 倍大きくなるとの報告⁵⁶⁾を考慮し、本研究においてはリソソーム体積を細胞体積の 5% と仮定して推算した (実験の部 データ解析参照)。その結果、リソソーム内濃度は azithromycin、solithromycin、clarithromycin で高く、 1.19×10^3 – $13.6 \times 10^3 \mu\text{M}$ の濃度域に達することが示された (Table 4)。

Table 4. IC₅₀ values, estimated intralysosomal concentrations, and physicochemical and pharmacokinetic parameters of macrolides and a ketolide.

	Ery	Cla	Rox	Azi	Jos	Sol
IC ₅₀ (μ M)	70.4	73.6	190	514	63.7	52.5
Lysosomal Conc. (μ M)	410	3.49 \times 10 ³	1.19 \times 10 ³	13.6 \times 10 ³	420	4.65 \times 10 ³
Lysosomal Conc./IC ₅₀	5.8	47.4	6.3	26.5	6.6	88.6
Single dose(mg)	500	250	150	500	1,000	800
C _{max} (μ M)	2.51	1.02	8.12	0.53	2.90	1.56
PBR(%)	73	42–50	73–96	7–50	15	78–84
C _{max} \times f _u (μ M)	0.68	0.51– 0.59	0.32–2.19	0.27–0.49	2.47	0.25–0.34
Vd(L)	40	126	13	3,083	NA	363
LogD _{5.0}	-0.8 7	0.03	0.06	-1.51	2.49	2.69
Reference	57-59)	60-62)	62-64)	62, 65), 66)	67)	68)

The values of logD predicted by Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software were obtained from CAS scifinder-n. The intralysosomal concentration of each compound was estimated based on the data in figure 10 by assuming that the lysosomal volume is 5% of the total cell volume. C_{max}; maximal serum or plasma concentration, f_u; fraction unbound, PBR; protein binding rate, Vd; volume of distribution, Ery; erythromycin, Cla; clarithromycin, Rox; roxithromycin, Azi; azithromycin, Jos; josamycin, Sol; solithromycin, NA; data not available.

第 2.4 節 リソソームにおける T-DM1 分解に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響

リソソームに集積した macrolide・ketolide 系抗菌薬がリソソーム内における T-DM1 の分解を抑制し、その殺細胞効果を減弱する可能性を考慮し、各種 macrolide・ketolide 系抗菌薬がリソソーム機能に及ぼす影響を免疫染色にて評価した(Figure 11)。ヒト IgG 抗体を用いて T-DM1 曝露後に細胞内に残存する trastuzumab を免疫蛍光染色した。ポジティブコントロールとして典型的なリソソーム阻害剤である chloroquine を使用した。その結果、chloroquine 共存下において、細胞小器官と細胞膜にヒト IgG 抗体による蛍光染色が認められたことから、リソソーム機能の阻害により T-DM1 の取り込みおよび細胞内異化作用が低下していることが示唆された。azithromycin および solithromycin 添加時では chloroquine と類似して細胞内に蛍光染色が確認された。一方、erythromycin、clarithromycin、roxithromycin および josamycin の共存下においてはコントロールと同様に細胞内の染色が確認されなかった。以上の結果より、azithromycin および solithromycin は T-DM1 の分解を阻害し、T-DM1 の殺細胞効果を減弱する可能性が示された。

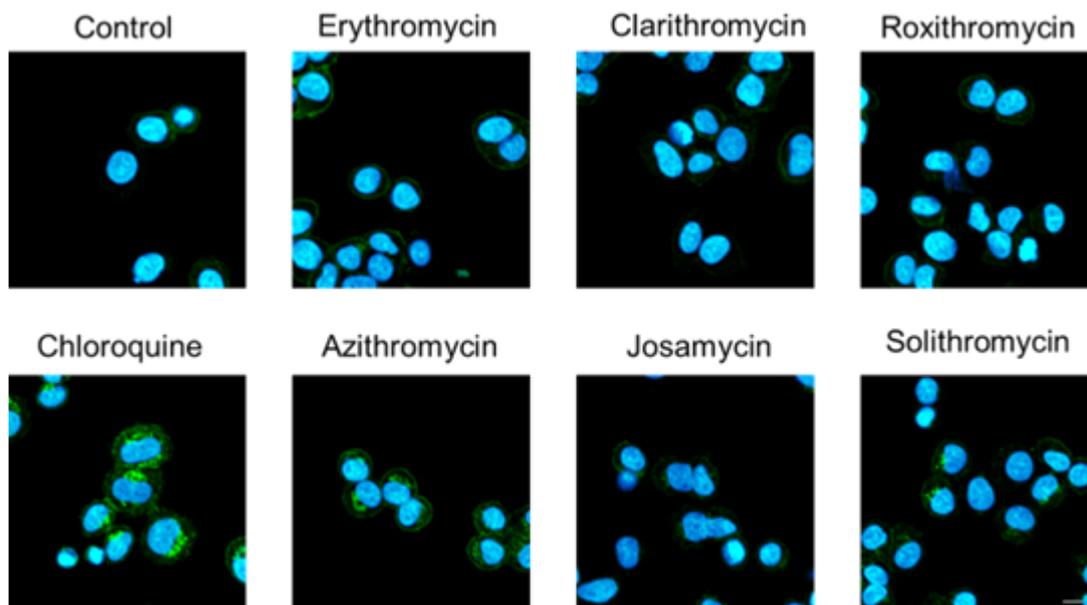


Figure 11. Immunofluorescence staining of T-DM1. KPL-4 cells were pulsed with 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ T-DM1 for 15 min at 37°C and chased for 1 day in the presence or absence of chloroquine (10 μM), macrolides (30 μM), and solithromycin (30 μM). T-DM1 (green) and nuclei (blue) were observed by confocal fluorescence microscopy. The results were replicated in two biologically independent experiments. Scale bar, 10 μm

第 2.5 節 考察

T-DM1 の薬効減弱は *macrolide*・*ketolide* 系抗菌薬のリソソームへの集積と SLC46A3 阻害によるものである可能性が示された。*Macrolide*・*ketolide* 系抗菌薬は弱塩基性の薬物であるため、酸性環境のリソソーム内へ良好に移行した後、イオン形に解離し、イオントラッピングされることでリソソーム内に蓄積する⁶⁹⁾⁷⁰⁾。SLC46A3 は T-DM1 の活性代謝物 Lys-SMCC-DM1 をリソソーム内から細胞質へ輸送するとされるトランスポーターであるため、SLC46A3 に対する阻害効果は T-DM1 の薬効発現を阻害すると考えられる。当研究室における先行研究において、*erythromycin* および *clarithromycin* が SLC46A3 を介した 5-CF の取り込みを阻害することが示されているが、本研究においても同様に *roxithromycin*、*azithromycin*、*josamycin* および *solithromycin* が SLC46A3 を介した 5-CF の取り込みを阻害することが示された。*Macrolide*・*ketolide* 系抗菌薬における SLC46A3 阻害の IC₅₀ 値は 50 μM 以上であり、一般的なトランスポーターに対する阻害の強度としては中程度であったが、その高いリソソーム移行性により、リソソーム内濃度が IC₅₀ 値を大きく上回り、結果として T-DM1 の効果を減弱させたと考えられる。

Azithromycin は、他の *macrolide* 系抗菌薬と比較して、弱い SLC46A3 阻害活性を示したが、T-DM1 の殺細胞活性を減弱する効果は最も大きかった。その理由として、*azithromycin* はその構造内に 2 つの解離性アミンを有するジカチオンであり、酸性環境下での分配係数 logD_{5.0} は負の値を示すため、他の *macrolide*・*ketolide* 系抗菌薬よりもイオントラッピング効果が大きく、優れたリソソーム移行性を示すことが推察された。このことは、細胞内への集積性が BafA により顕著に低下したことから支持される。また、リソソーム内の薬物濃度を評価した研究としては、多形核白血球細胞を用いた研究において、*azithromycin* のリソソーム内濃度は細胞質の 38 倍高くなるとの報告⁷¹⁾や、典型的なリソソーム指向性薬物 *chloroquine* のリソソーム内濃度は 20 mM を超えるとの報告⁷²⁾もある。このことから、今回、推察したリソソーム内濃度は妥当であると考えられる。

Azithromycin の T-DM1 効果減弱の機序には、リソソームへの集積を伴う SLC46A3 の輸送阻害だけでなく、リソソームの機能低下も関与する可能性が考えられる。今回実施した免疫蛍光染色の結果から、*azithromycin* 共存下において T-DM1 の分解が抑制されることが示された。しかし、その分子機構の解明には至っていない。これまでに BafA による V-ATPase の阻害はリソソームでの T-DM1 の分解および Lys-SMCC-DM1 の生成を抑制し、T-DM1 に対する耐性を惹起するとの報告⁷³⁾や、*azithromycin* の曝露がリソソーム酵素活性を低下させるとの報告⁷⁴⁾がある。したがって、T-DM1 の薬理効果に対する *azithromycin* の影響は、SLC46A3 輸送機能の阻害効果のみではなく、リソソーム機能に影響を与

える複合的なメカニズムと推察される。

T-DM1 の効果減弱における SLC46A3 機能阻害とリソソーム機能阻害のそれぞれの寄与率については不明である。しかし、これまでの研究において、SLC46A3 に対して阻害効果を有さない低濃度の chloroquine は T-DM1 の効果を減弱しないことが示されている。azithromycin によるリソソーム機能阻害効果は chloroquine よりも小さいと考えられるため、azithromycin による T-DM1 の減弱効果において、低濃度域においては SLC46A3 阻害の影響が大きく、高濃度域になるとリソソーム機能変化による影響の寄与が相対的に大きくなると推察される。しかし、リソソーム機能の変化が SLC46A3 の輸送機能にも影響を及ぼす可能性も考慮しなければならないため、それぞれの寄与を分離評価することは困難であると推察される。

本研究で用いた macrolide・ketolide 系抗菌薬の濃度 (2-3 μM) は臨床用量での非タンパク結合型薬物の最高血中濃度よりも高いが、臨床においても macrolide・ketolide 系抗菌薬と T-DM1 との薬物相互作用は十分起こり得ると考えられる。一般に、macrolide・ketolide 系抗菌薬は良好な組織移行性を有し、特に clarithromycin、azithromycin および solithromycin は他の macrolide 系抗菌薬と比較しても大きい分布容積を示す。さらに、azithromycin 徐放性製剤 2 g を投与した際の乳腺組織濃度は、平均 4.81 μM になるとの報告もある⁷⁵⁾。したがって、azithromycin は乳癌組織にも同様に移行する可能性が考えられる。Erythromycin と roxithromycin の分布容積は clarithromycin、azithromycin より小さく、推定されたリソソーム内濃度の低さと一致している。このことは azithromycin のイオントラッピングによるリソソームでの高濃度推定を支持している。

第 2.6 節 小括

第 2 章では macrolide・ketolide 系抗菌薬が T-DM1 の殺細胞効果を減弱させる機序の一つとして、SLC46A3 の輸送機能の阻害に関わる可能性を探るため、SLC46A3 介在性の 5-CF の取り込みに対する各種 macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響を検討した。その結果、臨床で汎用される各種 macrolide・ketolide 系抗菌薬（erythromycin、clarithromycin、roxithromycin、azithromycin、josamycin および solithromycin）は SLC46A3 の輸送活性を阻害し、その IC₅₀ 値は 50–500 μM の範囲であった。しかし、第 1 章で最も強力に T-DM1 の薬効を減弱した azithromycin の IC₅₀ 値は最も大きく、SLC46A3 の輸送機能に対する阻害程度は弱いことが示された。

続いて、各 macrolide・ketolide 系抗菌薬のリソソーム内濃度を Baf A を用いて推定を試みた。その結果、macrolide・ketolide 系抗菌薬は顕著にリソソームへ集積し、azithromycin は $13.6 \times 10^3 \mu\text{M}$ と高濃度に蓄積されることが推察された。

また、T-DM1 を曝露した細胞についてヒト IgG 抗体を用いた免疫蛍光染色の検討より、azithromycin および solithromycin はリソソーム機能を阻害し、リソソーム内での T-DM1 分解を抑制している可能性が示唆された。

以上より、macrolide・ketolide 系抗菌薬による T-DM1 の薬効減弱には、良好なリソソーム移行性を伴う SLC46A3 の輸送阻害とリソソーム機能阻害が関与することが示唆された。

第 3 章 リソソーム指向性薬物が T-DM1 の殺細胞効果に与える影響

Macrolide・ketolide系抗菌薬は高いリソソーム指向性を示し、SLC46A3の輸送機能を含むリソソーム機能へ影響を及ぼすことから、T-DM1の薬効を減弱させることが示唆された。リソソーム指向性が高い化合物の特徴として、細胞膜を比較的良好に通過するが、酸性環境であるリソソーム内ではイオン化し、イオントラッピングによってリソソーム膜を通過しにくい弱塩基性両親媒性であることが挙げられる⁷⁶⁾。典型的なリソソーム指向性薬物かつリソソーム機能阻害剤としてはchloroquineが知られている⁷⁰⁾。これまでの先行研究においてchloroquineはSLC46A3輸送を阻害せず、T-DM1の薬効へも低濃度域においては顕著な影響はないことが示されている²⁶⁾。しかし、T-DM1の薬効に対する他のリソソーム指向性薬物の影響は検討されていない。そこで、第3章では臨床的視点から、リソソーム指向性の高い薬物あるいはリソソーム機能に影響を及ぼし得る医薬品を選択し、T-DM1の殺細胞効果に及ぼす影響について検討した。

第 3.1 節 T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす amiodarone の影響

Amiodarone は分布容積が 100 L/kg 以上と非常に大きく、血中よりも組織分布が 100 倍以上にもなることが知られている⁷⁷⁾。Amiodarone はリソソーム内のホスホリパーゼ A2 を阻害し、ホスホリピドーシスを引き起こすことが報告されている⁷⁸⁾。また、amiodarone は心機能が低下した患者の不整脈治療に選択される⁷⁹⁾。乳癌治療においては心毒性のある anthracycline 系薬剤および trastuzumab (T-DM1 含む) が使用される⁸⁰⁾。したがって、これら医薬品によって心毒性を起こした際に不整脈を併発した場合、amiodarone と T-DM1 が併用される可能性がある。そこで、amiodarone と T-DM1 の関連について検討した。Amiodarone は 10 μM 以上では細胞毒性を強く示した。T-DM1 存在下における amiodarone 3 μM 曝露時の細胞生存率はコントロールの $42.8 \pm 6.6\%$ となったが、amiodarone 非曝露時の細胞生存率 $35.8 \pm 6.9\%$ に対して有意な変化は認められなかった (Figure 12)。

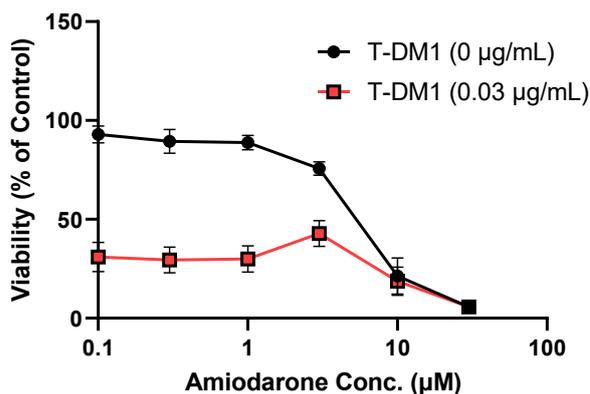


Figure 12. Effect of amiodarone on cell viability in the presence or absence of T-DM1. Amiodarone does not counteract T-DM1 cytotoxicity in HCC1954 cells. HCC1954 cells were exposed to T-DM1 (0 $\mu\text{g/mL}$, black; 0.03 $\mu\text{g/mL}$, red) for 96 h with test drugs at the indicated concentration. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$) obtained from two biologically independent experiments.

第 3.2 節 T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす tamoxifen の影響

Tamoxifen は分布容積が 60 L/kg と大きく、組織中濃度は血清中濃度の約 60 倍になることが報告されている⁸¹⁾。Tamoxifen はリソソーム指向性が高い薬物の一つであり、リソソーム機能に影響を及ぼすことが報告されている^{78) 82) 83)}。また、ホルモン受容体陽性乳癌に対して使用される医薬品であり、ホルモン受容体陽性かつ HER2 受容体陽性乳癌患者においては T-DM1 と併用されることも想定される^{84) 85)}。そこで、tamoxifen と T-DM1 の関連について検討した。T-DM1 非存在下において tamoxifen は 10 μ M 以上の濃度で細胞毒性を示した。T-DM1 存在下に tamoxifen を曝露させた条件において、その細胞生存率に有意な変化は認められなかった(Figure 13)。

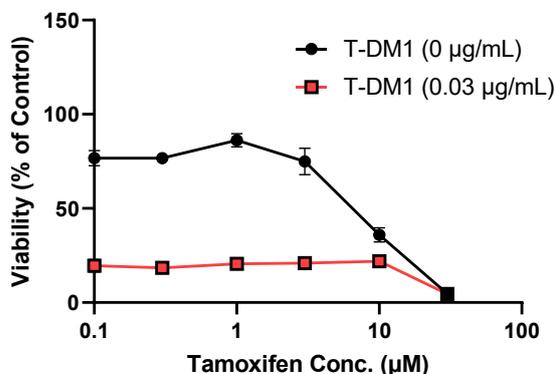


Figure 13. Tamoxifen does not counteract T-DM1 cytotoxicity in HCC1954 cells. Effect of tamoxifen on cell viability in the presence or absence of T-DM1. HCC1954 cells were exposed to T-DM1 (0 μ g/mL, black; 0.03 μ g/mL, red) for 96 h with test drugs at the indicated concentration. Data are presented as means \pm SEM (n = 4) obtained from two biologically independent experiments.

第 3.3 節 T-DM1 の殺細胞効果および SLC46A3 に及ぼす proton pump inhibitors (PPIs) の影響

PPIs は胃潰瘍や十二指腸潰瘍をはじめとする消化管出血やその予防に対して頻繁に処方される⁸⁶⁾。PPIs は胃壁細胞において H^+/K^+ ATPase を阻害し、胃酸の分泌を強力に抑制する。阻害の分子機構として、胃酸により活性化された PPIs が H^+/K^+ ATPase 上のシステインと結合し、ジスルフィド結合を形成することで H^+/K^+ ATPase 機能を不可逆的に失活させる⁸⁷⁾。

液胞型 ATPase である V-ATPase はリソソーム膜に存在し、 H^+ を細胞質からリソソーム内へ取り込み、リソソーム内の酸性化に寄与している。PPIs は V-ATPase も阻害することが報告されている^{88) 89)}。さらに、PPIs はリソソーム酵素であるカテプシン B やレグマインの阻害作用も有する⁹⁰⁾。そこで、PPIs と T-DM1 の相互作用の可能性について検討した。T-DM1 非存在下において、PPIs 単独曝露により細胞生存率の上昇を認めた。T-DM1 存在下においても同様の傾向が認められたが、その影響は T-DM1 非存在下での生存率を上回るものではなかった。そのため、PPIs は T-DM1 の殺細胞効果には影響を与えないと推測された (Figure 14)。一方、SLC46A3 を介した 5-CF の取り込みは omeprazole、lansoprazole 共存下において、それぞれコントロールの 21.7%、7.0% に低下した。一方、vonoprazan は 5-CF の取り込みを有意に阻害しなかった (Figure 15)。

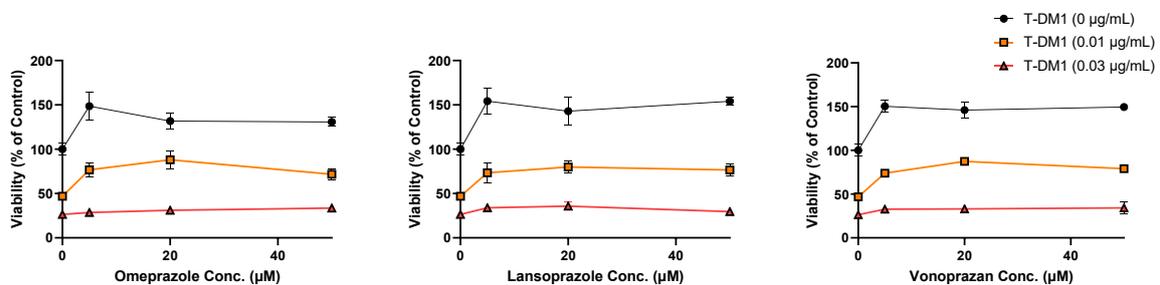


Figure 14. PPIs do not counteract T-DM1 cytotoxicity in HCC1954 cells. Effect of PPIs on cell viability in the presence or absence of T-DM1. HCC1954 cells were exposed to T-DM1 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, black; 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, yellow; 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, red) for 96 h with test drugs at the indicated concentration. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$) obtained from two biologically independent experiments

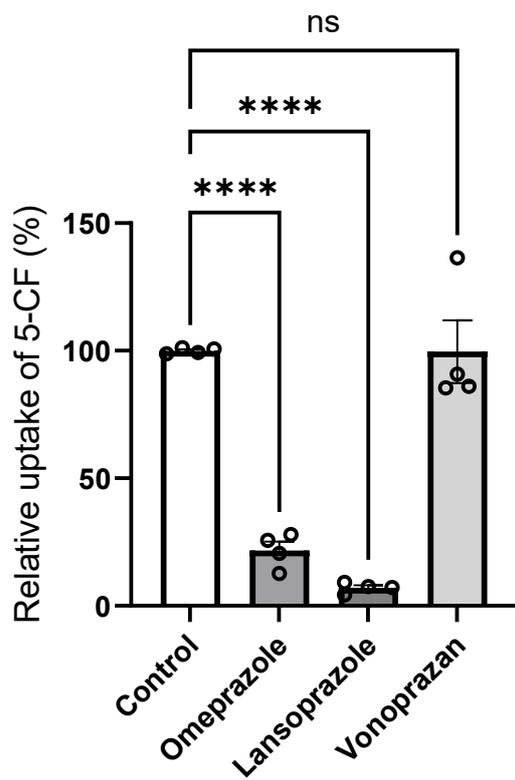


Figure 15. The effect of PPIs on SLC46A3 transport activity. SLC46A3-mediated 5-CF uptake was evaluated at pH 5.0 in the presence or absence of each PPIs (200 μ M). Data are presented as the mean \pm SEM (n = 4) (****: $P < 0.0001$ one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). Relative uptake is shown as a percentage of uptake without inhibitors (control) in SLC46A3 dC cells subtracted by that in mock cells.

第 3.4 節 考察

Amiodarone および tamoxifen は代表的なリソソーム指向性薬物であるが、T-DM1 の殺細胞効果に影響を及ぼさないことが示された。このことは、リソソーム指向性という特徴のみでは、T-DM1 の薬効発現には影響せず、SLC46A3 輸送機能やリソソーム機能を十分に阻害する必要があることを示している。Amiodarone は ClogP 7.57、pKa 8.47 であり、脂溶性が高く、弱塩基性を示す。また、ホスホリパーゼ A2 を強力に阻害する (IC₅₀ 8.3 μM) ことが知られている⁷⁸⁾。したがって、10 μM 以上の濃度においては、リン脂質との相互作用により細胞毒性を強く示したと考えられる。Tamoxifen は ClogP 5.93、pKa 8.76 であり、ホスホリパーゼ A2 阻害作用 (IC₅₀ 7.7 μM) も強く⁷⁸⁾、amiodarone と類似の性質を有しており、T-DM1 に対する影響も同様に認められなかった。これら薬物が T-DM1 の活性代謝物 Lys-SMCC-DM1 の遊離に関与するリソソーム内タンパク質分解酵素に与える影響は不明であるが、少なくとも低濃度域においては SLC46A3 機能やリソソーム内タンパク質分解酵素に影響を与えていないことが示唆された。

PPIs は塩基性であり、各薬物の特徴 (omeprazole pKa 8.78、lansoprazole pKa 9.56 および vonoprazan pKa 9.06) から血液中で多くはイオン形として存在し、リソソーム指向性薬物と比較すると脂溶性が低い (omeprazole logP 2.36、lansoprazole logP 2.58 および vonoprazan logP 2.36) ことが挙げられる。したがって、PPIs は高濃度においては SLC46A3 の輸送機能を阻害したものの、検討した低濃度域において T-DM1 の薬効に影響を及ぼさなかったことは、PPIs のリソソーム指向性が低いためと考えられる。

総括

本研究では、ADC、特に T-DM1 の薬効に及ぼす医薬品の影響について検討した。第 1 章では、macrolide・ketolide 系抗菌薬が T-DM1 の薬効を減弱させ、azithromycin でその影響が最も強いことを示した。この影響は HER2 陽性乳癌細胞である KPL-4 細胞および HCC1954 細胞で共通していた。また、azithromycin は DM1 および T-DXd の薬効には影響を及ぼさなかった。以上より、macrolide・ketolide 系抗菌薬が SLC46A3 を介した T-DM1 の活性代謝物 Lys-SMCC-DM1 の輸送に影響を及ぼしている可能性が考えられた。第 2 章では、macrolide・ketolide 系抗菌薬が T-DM1 の薬効を減弱させる機序について検討した。Macrolide・ketolide 系抗菌薬は SLC46A3 の基質である 5-CF の輸送を阻害し、azithromycin は SLC46A3 を介した Lys-SMCC-DM1 の取り込みを阻害した。また、macrolide・ketolide 抗菌薬による SLC46A3 輸送阻害は macrolide の環状構造には依存していなかった。続いて、本章で示した macrolide 系抗菌薬の IC₅₀ 値は第 1 章で検討した濃度域より高値であったため、macrolide 系抗菌薬のリソソーム移行性について検討した。その結果、macrolide 系抗菌薬は SLC46A3 を阻害し得る良好なリソソーム移行性を示し、特に azithromycin はリソソームへの移行が顕著であった。さらに免疫染色の結果、azithromycin はリソソーム内における T-DM1 の分解を抑制している可能性が示された。以上より、macrolide・ketolide 系抗菌薬による T-DM1 の殺細胞効果の減弱は、SLC46A3 の阻害とリソソーム機能の障害が T-DM1 の薬効に関与する Lys-SMCC-DM1 の細胞質移行と生成低下に寄与している可能性を示した。第 3 章では、臨床で使用されるリソソーム指向性薬物、リソソーム機能に影響を及ぼし得る薬物と T-DM1 の殺細胞効果に与える影響について検討した。Amiodarone、tamoxifen および PPIs はいずれも T-DM1 の薬効には影響を与えなかった。以上より、リソソーム指向性という特徴のみでは T-DM1 の薬効には影響を与えないことが示された。

これらの結果は、macrolide 系抗菌薬と T-DM1 の併用について警鐘を促すものである。Macrolide 系抗菌薬は抗菌作用以外にも抗炎症作用を持つという特徴から長期投与され^{91) 92)}、癌患者ではリソソームの酸性化に寄与する V-ATPase の活性化によりリソソーム pH がより低いことが報告されている⁹³⁾。さらに、チャールソン併存疾患指数で示された乳癌患者 5-16% は慢性肺疾患を有していると報告されている^{94) 95) 96) 97) 98)}。加えて、azithromycin は米国で毎年 4,000 万人以上処方されているとのデータもある^{99) 100)}。2018 年、世界で 200 万人が乳癌と診断されている¹⁰¹⁾。以上の背景を踏まえると、T-DM1 と macrolide 系抗菌薬は臨床において併用されていることを懸念する必要がある。しかし、両医薬品が実臨床においてどの程度併用されているかは不明であり、実際の併用による治療成績への影響は報告されていない。今後、リアルワールドデータを活用するなど臨

床研究において、両医薬品の併用による治療成績の解析の実施が望まれる。

以上のように、本研究において macrolide・ketolide 系抗菌薬と T-DM1 の併用が T-DM1 の薬効を減弱する可能性を示した。今後はさらに異なる ADC や *in vivo* での検証が必要と考えるが、本研究で得られた知見は、薬物-ADC 相互作用という新たな概念を確立するとともに、相互作用に関わる機構の分子基盤を与えるものであり、今後の最適な ADC 治療の実践に資するものである。

実験の部

実験材料

1. 使用薬物

Amiodarone Hydrochloride	東京化成工業
Ansamitocin P-3	Cayman Chemical Company
Azithromycin dihydrate	東京化成工業
Bafilomycin A1	Cayman Chemical Company
5-Carboxyfluorescein hydrate (5-CF)	東京化成工業
Chloroquine diphosphate	東京化成工業
Clarithromycin	東京化成工業
Dirithromycin	BLD Pharmatech Ltd.
DM1	Cayman Chemical Company
ENHERTU [®] (trastuzumab deruxtecan)	第一三共株式会社
Erythromycin	富士フイルム和光純薬
Gamithromycin	BLD Pharmatech Ltd.
KADCYLA [®] (trastuzumab emtansine)	中外製薬
Lansoprazole	BLD Pharmatech Ltd.
Lys-SMCC-DM1 trifluoroacetate	Invivochem
Oleandomycin	Cayman Chemical Company
Omeprazole	BLD Pharmatech Ltd.
Roxithromycin	BLD Pharmatech Ltd.
Solithromycin	Cayman Chemical Company
Spiramycin	Cayman Chemical Company
Tamoxifen Citrate	Wako
Telithromycin	Bioaustralis
Tulathromycin	Cayman Chemical Company
Tylosin tartrate	BLD Pharmatech Ltd.
Vonoprazan	Chemscenells

2. 細胞培養

D-MEM (high glucose) with L-glutamine and phenol red	富士フイルム和光純薬
Fetal bovine serum	Corning
Penicillin-streptomycin solution	富士フイルム和光純薬
RPMI-1640 with L-glutamine and phenol red	富士フイルム和光純薬

3. 免疫染色

Albumin, bovine serum, fatty acid free, pH 7.0	ナカライテスク
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor [®] 488) antibody	Abcam
Monoclonal ANTI-FLAG [®] M2 antibody	Sigma-Aldrich
4%-Paraformaldehyde phosphate buffer solution	ナカライテスク

4. 取り込み実験

Pierce BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific
------------------------------	--------------------------

5. 細胞生存率アッセイ

Cell Counting kit-8	同仁化学研究所
---------------------	---------

6. T-DM1 染色

Alexa Fluor® 488 affiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)	Jackson immunoresearch Labs
---	-----------------------------

7. LC-MS/MS

Acetonitrile -Plus- LC/MS 用	関東化学
Formic acid	ナカライテスク

その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

8. 実験細胞

HCC1954	JCRB 細胞バンク
KPL-4	川崎医科大学
MDCKII	ECACC

KPL-4、MDCKII 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。HCC1954 細胞は RPMI-1640 medium で培養した。すべての培地は 10% fetal bovine serum (FBS)、100 units/ mL penicillin G および 100 µg/ mL streptomycin を添加した。細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した

9. 使用機器

マイクロ化学天秤	BCA64I	Sartorius
pH メーター	HM-25R	東亜ディーケーケー
マイクロプレートリーダー	Varioskan [™] Flash2.4 FP-6500	Thermo Scientific Fisher
恒温槽	サーモボックス	Thermonics
CO ₂ インキュベーター	FORMA DIRECT HEAT	Thermo Scientific Fisher
インキュベーター	EYELA SLI-220	東京理化機械
恒温振とう機	Bioshaker BR-23FP	TAITEC
卓上型アスピレーター	SAP-102	三商
蛍光顕微鏡	Biozero BZ-710	KEYENCE
共焦点レーザー走査型顕微鏡	FV1000-D IX81	Olympus
UPLC-MS システム	ACQUITY UPLC® H-Class -Xevo TQD system	Waters
UPLC カラム	Inertsustain C18 (2.1 × 100 mm, 5 µm)	GL Science

10. 緩衝液の組成

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

KCL	5.330 mM
NaCl	136.900 mM

NaHCO ₃	4.170 mM
KH ₂ PO ₄	0.441 mM
Na ₂ HPO ₄	0.338 mM
CaCl ₂	1.260 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.493 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.407 mM
D-Glucose	5.560 mM
Citrate (pH 4.0–4.5) or HEPES (pH 7.4) or MES (pH 5.0–6.5)	10.000 mM

実験方法

11. 細胞生存率アッセイ

KPL-4 細胞もしくは HCC1954 細胞を 3,000 cell/well で 96 well プレートに播種した。翌日、試験薬存在下に T-DM1、T-DXd、DM1 をそれぞれ 4 日間、6 日間、2 日間曝露し、細胞生存率を cell counting kit-8 を用い、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。PPI の細胞生存率アッセイでは、予備検討において PPI の細胞毒性が強く影響したため、PPI を RPMI(FBS-) で希釈し、連日 4 時間のみの曝露とし、残りの時間を RPMI(FBS+) で希釈した T-DM1 を曝露した。

12. 取り込み実験

MDCKII 細胞(mock/SLC46A3 dC)を 2.0×10^4 cells/well で播種し、2 日間培養した。10 mM MES (pH 5.0)を含む HBSS 150 μ L にて 37°C、3–5 min プレインキュベートした。2 μ M 5-CF を含む試験化合物 100 μ L を 5 min 作用させた。その後、氷冷した 10 mM HEPES(pH 7.4)を含む HBSS にて反応を停止させ、さらに 2 回洗浄した。細胞溶解液(0.1% TritonX-100 を含む 0.3N NaOH 水溶液) 200 μ L を添加し細胞をよく溶解し、37°C、15 min インキュベートした。マイクロプレートリーダーにて蛍光強度(Ex/Em = 492 nm/518 nm)を測定した。BCA 法にてタンパク量を定量し、取り込み量は細胞のタンパク量で補正した。

13. リソソーム集積性の検討

KPL-4 細胞を 24 well プレートに 1.5×10^5 cells/well で播種した。Opti-MEM で 1 回洗浄後、BafA 100 nM もしくは 0.1% DMSO を含む Opti-MEM 500 μ L で 30 min プレインキュベートした。その後、BafA 100 nM 存在下もしくは非存在下において各 macrolide・ketolide 系抗菌薬(2 μ M)を添加し、1 日間インキュベートした。氷冷した PBS にて 2 回洗浄し、50% acetonitrile で抽出 (室温 30 min) 後、LC-MS/MS にて定量した。

BCA 法にてタンパク量を定量し、取り込み量は細胞のタンパク量で補正した。

14. 免疫染色

KPL-4 細胞 (1.0×10^5 cells/dish) を 35 mm glass-bottom dish に播種した。次の日、T-DM1 ($1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) で 15 分間作用させ、PBS で 2 回洗浄した。その後、chloroquine ($10 \mu\text{M}$)、各 macrolide・ketolide 系抗菌薬 ($30 \mu\text{M}$) 存在下、1 日間培養した。細胞は免疫染色と同様の過程でブロッキングまで行った。その後、抗ヒト IgG 抗体 (Alexa Fluor® 488) ($1:1,000$) で 1 時間 (37°C) 作用させた。PBS-T で細胞を 2 回洗浄後、核を Hoechst33342 ($10 \mu\text{M}$) で染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 で画像を取得した。

15. LC-MS/MS

Macrolide・ketolide 系抗菌薬の細胞内取り込み量における LC-MS/MS の実験条件は次の通り実施した。LC-MS/MS システムは ACQUITY UPLC H-Class system/Xevo TQD triple quadrupole tandem mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) を用い、分析用カラムは inertsustain C18 (2.1×100 mm, $5 \mu\text{m}$) column (GL Science Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。移動相は 0.1% formic acid (A)、acetonitrile (B) を用いた。内標準物質は ansamitocin P-3 を使用した。流速 $0.2 \text{ mL}/\text{min}$ 、グラジエントは移動相 A 液:B 液 = $95:5(0-0.5 \text{ min}) \rightarrow 5:95(0.5-1.5 \text{ min}) \rightarrow 5:95(1.5-5.4 \text{ min}) \rightarrow 95:5(5.4-5.5 \text{ min}) \rightarrow 95:5(5.5-8 \text{ min})$ とした。

イオン化はエレクトロスプレーイオン化法のポジティブモードを選択し、azithromycin、clarithromycin、erythromycin、josamycin、roxithromycin、solithromycin、ansamitocin P-3 はそれぞれ m/z $749.6 \rightarrow 116$ 、 m/z $748.4 \rightarrow 158.1$ 、 m/z $734.4 \rightarrow 158.1$ 、 m/z $828.6 \rightarrow 109.1$ 、 m/z $837.6 \rightarrow 158.2$ 、 m/z $845.5 \rightarrow 116.1$ 、 m/z $635.2 \rightarrow 547.2$ を検出した。

Lys-SMCC-DM1 の細胞内取り込み量の測定は、上記と同じ装置およびカラムを用い、グラジエントは移動相 A 液:B 液 = $95:5(0-0.5 \text{ min}) \rightarrow 5:95(0.5-3 \text{ min}) \rightarrow 5:95(3-6.5 \text{ min}) \rightarrow 95:5(6.5-6.6 \text{ min}) \rightarrow 95:5(6.6-8 \text{ min})$ とした。 m/z は $1103.2 \rightarrow 485.2$ を検出した。

16. 解析

すべての回帰分析は Graphpad Prism v9.4.1. (Graphpad Software, Inc., SD, USA) を使用した。IC₅₀ は下記の式に従って求めた。

$$\text{uptake (\% of control)} = \frac{\text{uptake}_{\text{top}} - \text{uptake}_{\text{min}}}{1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{I}\right)^{\text{HillSlope}}} + \text{uptake}_{\text{min}}$$

uptake_{top}: 最大取り込み率、uptake_{min}: 最小取り込み率、*I*: 阻害剤濃度

リソソーム内濃度の推定に当たっては次の式により推算した。

Lysosomal concentration of test drug (μM)

$$= \frac{\text{Test drug without bafA (pmol)} - \text{test drug with bafA (pmol)}}{\text{LV} (\mu\text{m}^3) \times 4 \times 10^5} \times 10^9$$

LV: the volume of lysosomes per cell.

SLC46A3 dC 細胞を用いた取り込み実験においては mock 細胞における取り込み量を減ずることにより算出した。

濃度依存性試験のデータはミカエリス・メンテン式によって導いた。

$$v = \frac{V_{\text{max}} \times S}{K_m + S}$$

v: 取り込み速度、*S*: 基質濃度

17. 統計処理

データは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で表記した。統計解析は Graphpad Prism v9.4.1 を用いた。2 群間の比較は t-検定 (Student's t-test) により行った。また、多群間の比較には、分散分析 (ANOVA) の後に Tukey の多重比較もしくは Dunnett の多重比較を用いた。P < 0.05 を有意水準とした。

掲載論文

Macrolide and Ketolide Antibiotics Inhibit the Cytotoxic Effect of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Breast Cancer Cells: Implication of a Potential Drug-ADC Interaction in Cancer Chemotherapy, Keisuke Kiyomiya, Ryuto Tomabechi, Naoki Saito, Kenta Watai, Tappei Takada, Yoshiyuki Shirasaka, Hisanao Kishimoto, Kei Higuchi, and Katsuhisa Inoue, *Molecular Pharmaceutics*, 20, 6130–6139 (2023)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究に対する基礎的考え方からきめ細やかな御教授をいただき、終始ご懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師、東京薬科大学薬学部 井上 勝央教授に深なる敬意を表します。

本研究を遂行するにあたり、丁寧な御指導、御助言を頂き、多大な御支援を賜りました東京薬科大学 薬学部 岸本 久直 講師に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、丁寧な御指導、御助言を頂き、多大な御支援を賜りました東京薬科大学 薬学部 樋口 慧 講師に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、基礎的事項を一から丁寧な御指導、御助言を頂き、多大な御支援を賜りました北里大学 薬学部 苜米地 隆人 助教に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大な御支援、御助言を賜りました東京大学医学部附属病院 薬剤部 高田 龍平 教授に深謝いたします。

大学院進学に当たり、多大なご助言を賜りました昭和大学 先端がん治療研究所 今村 知世 准教授に心より御礼申し上げます。

共同実験者であり、本論文作成に多大なる貢献をして下さいました齊藤 直希 学士、渡井 健太 学士に心から御礼申し上げます。

大学院進学にあたり、診療業務において多大なご支援賜りました慶應義塾大学薬剤部部長 大谷 壽一 教授、同副部長 青森 達 准教授をはじめ、薬剤部職員の皆様に心から御礼申し上げます。

私事ではありますが、学位取得にあたり、常に暖かく見守ってくださった妻、長女、長男に心から感謝いたします。

また、卒業生諸氏を含め歴代の東京薬科大学薬学部 薬物動態制御学教室各位に厚く御礼申し上げるとともに、末筆ではございますが、皆様への感謝と皆様のこれからの御多幸と御健勝をお祈り申し上げます。

令和 6 年 1 月

清宮 啓介

引用文献

- 1) Palleria C., Di Paolo A., Giofrè C., Caglioti C., Leuzzi G., Siniscalchi A., De Sarro G., Gallelli L., *J. Res. Med. Sci.*, **18**, 601-610 (2013).
- 2) Shakeri-Nejad K., Stahlmann R., *Expert Opin. Pharmacother.*, **7**, 639-651 (2006).
- 3) Lee C. H., Shen M. C., Tsai M. J., Chang J. S., Huang Y. B., Yang Y. H., Hsieh K. P., *Sci. Rep.*, **12**, 7002 (2022).
- 4) Zhao M., Ma J., Li M., Zhang Y., Jiang B., Zhao X., Huai C., Shen L., Zhang N., He L., Qin S., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (2021).
- 5) Nigam S. K., *Nat Rev Drug Discov*, **14**, 29-44 (2015).
- 6) Choudhuri S., Klaassen C. D., *Int. J. Toxicol.*, **25**, 231-259 (2006).
- 7) Kalliokoski A., Niemi M., *Br. J. Pharmacol.*, **158**, 693-705 (2009).
- 8) Zamek-Gliszczynski M. J., Taub M. E., Chothe P. P., Chu X., Giacomini K. M., Kim R. B., Ray A. S., Stocker S. L., Unadkat J. D., Wittwer M. B., Xia C., Yee S. W., Zhang L., Zhang Y., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **104**, 890-899 (2018).
- 9) Sudsakorn S., Bahadduri P., Fretland J., Lu C., *Current drug metabolism*, **21**, 403-426 (2020).
- 10) Lairson L. L., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **72**, 102251 (2023).
- 11) Chiriboga C. A., *Expert Rev. Neurother.*, **17**, 955-962 (2017).
- 12) Gowda V. L., Fernandez-Garcia M. A., Jungbluth H., Wraige E., *Arch. Dis. Child.*, **108**, 511-517 (2023).
- 13) Broekhoff T. F., Sweegers C. C. G., Krijkamp E. M., Mantel-Teeuwisse A. K., Leufkens H. G. M., Goettsch W. G., Vreman R. A., *Value Health*, **24**, 759-769 (2021).
- 14) Ma L., Wang C., He Z., Cheng B., Zheng L., Huang K., *Curr. Med. Chem.*, **24**, 3373-3396 (2017).
- 15) Joubert N., Beck A., Dumontet C., Denevault-Sabourin C., *Pharmaceuticals (Basel)*, **13** (2020).
- 16) Marmé F., *Oncology research and treatment*, **45**, 26-36 (2022).
- 17) Mindell J. A., *Annu. Rev. Physiol.*, **74**, 69-86 (2012).
- 18) Jain N., Smith S. W., Ghone S., Tomczuk B., *Pharm. Res.*, **32**, 3526-3540 (2015).
- 19) Baah S., Laws M., Rahman K. M., *Molecules*, **26** (2021).
- 20) Ogitali Y., Hagihara K., Oitate M., Naito H., Agatsuma T., *Cancer Sci.*, **107**, 1039-1046 (2016).
- 21) Hamblett K. J., Jacob A. P., Gurgel J. L., Tometsko M. E., Rock B. M.,

- Patel S. K., Milburn R. R., Siu S., Ragan S. P., Rock D. A., Borths C. J., O'Neill J. W., Chang W. S., Weidner M. F., Bio M. M., Quon K. C., Fanslow W. C., *Cancer Res.*, **75**, 5329-5340 (2015).
- 22) Zhao R., Matherly L. H., Goldman I. D., *Expert Rev. Mol. Med.*, **11**, e4 (2009).
- 23) Hunter F. W., Barker H. R., Lipert B., Rothé F., Gebhart G., Piccart-Gebhart M. J., Sotiriou C., Jamieson S. M. F., *Br. J. Cancer*, **122**, 603-612 (2020).
- 24) Barok M., Joensuu H., Isola J., *Breast Cancer Res.*, **16**, 209 (2014).
- 25) Kinneer K., Meekin J., Tiberghien A. C., Tai Y. T., Phipps S., Kiefer C. M., Rebelatto M. C., Dimasi N., Moriarty A., Papadopoulos K. P., Sridhar S., Gregson S. J., Wick M. J., Masterson L., Anderson K. C., Herbst R., Howard P. W., Tice D. A., *Clin. Cancer Res.*, **24**, 6570-6582 (2018).
- 26) Tomabechi R., Kishimoto H., Sato T., Saito N., Kiyomiya K., Takada T., Higuchi K., Shirasaka Y., Inoue K., *PNAS nexus*, **1**, pgac063 (2022).
- 27) Delgado J., Vleminckx C., Sarac S., Sosa A., Bergh J., Giuliani R., Enzmann H., Pignatti F., *ESMO open*, **6**, 100074 (2021).
- 28) Tateda K., Ishii Y., Kimura S., Horikawa M., Miyairi S., Yamaguchi K., *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, **13**, 357-367 (2007).
- 29) Klein J. O., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **16**, 427-431 (1997).
- 30) Zhanel G. G., Wierzbowski A. K., Hisanaga P., Hoban D. J., *Curr. Infect. Dis. Rep.*, **6**, 191-199 (2004).
- 31) Fernandes P., Pereira D., Watkins P. B., Bertrand D., *J. Med. Chem.*, **63**, 6462-6473 (2020).
- 32) "WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016–2018 early implementation.":
<<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277359/9789241514880-eng.pdf?ua=1>>.
- 33) Oakley G. M., Harvey R. J., Lund V. J., *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **17**, 30 (2017).
- 34) Lin X., Lu J., Yang M., Dong B. R., Wu H. M., *Cochrane Database Syst. Rev.*, **1**, Cd007716 (2015).
- 35) Kelly C., Chalmers J. D., Crossingham I., Relph N., Felix L. M., Evans D. J., Milan S. J., Spencer S., *Cochrane Database Syst. Rev.*, **3**, Cd012406 (2018).

- 36) Daley C. L., Iaccarino J. M., Lange C., Cambau E., Wallace R. J., Jr., Andrejak C., Böttger E. C., Brozek J., Griffith D. E., Guglielmetti L., Huitt G. A., Knight S. L., Leitman P., Marras T. K., Olivier K. N., Santin M., Stout J. E., Tortoli E., van Ingen J., Wagner D., Winthrop K. L., *Eur. Respir. J.*, **56** (2020).
- 37) Pea F., *Clin. Pharmacokinet.*, **57**, 177-189 (2018).
- 38) Van Bambeke F., Tulkens P. M., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **18 Suppl 1**, S17-23 (2001).
- 39) Westphal J. F., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **50**, 285-295 (2000).
- 40) Hughes J., Crowe A., *J. Pharmacol. Sci.*, **113**, 315-324 (2010).
- 41) Seithel A., Eberl S., Singer K., Auge D., Heinkele G., Wolf N. B., Dörje F., Fromm M. F., König J., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 779-786 (2007).
- 42) Ohno Y., Hisaka A., Suzuki H., *Clin. Pharmacokinet.*, **46**, 681-696 (2007).
- 43) Eberl S., Renner B., Neubert A., Reisig M., Bachmakov I., König J., Dörje F., Mürdter T. E., Ackermann A., Dormann H., Gassmann K. G., Hahn E. G., Zierhut S., Brune K., Fromm M. F., *Clin. Pharmacokinet.*, **46**, 1039-1049 (2007).
- 44) Hill K., Sucha E., Rhodes E., Carrier M., Garg A. X., Harel Z., Hundemer G. L., Clark E. G., Knoll G., McArthur E., Sood M. M., *JAMA internal medicine*, **180**, 1052-1060 (2020).
- 45) Agarwal S. K., Tong B., Bueno O. F., Menon R. M., Salem A. H., *Adv. Ther.*, **35**, 2015-2023 (2018).
- 46) Fleet J. L., Shariff S. Z., Bailey D. G., Gandhi S., Juurlink D. N., Nash D. M., Mamdani M., Gomes T., Patel A. M., Garg A. X., *BMJ open*, **3** (2013).
- 47) Lopus M., *Cancer Lett.*, **307**, 113-118 (2011).
- 48) Li C., Agarwal P., Gibiansky E., Jin J. Y., Dent S., Gonçalves A., Nijem I., Strasak A., Harle-Yge M. L., Chernyukhin N., LoRusso P., Girish S., *Clin. Pharmacokinet.*, **56**, 1069-1080 (2017).
- 49) Azar I., Alkassis S., Fukui J., Alsawah F., Fedak K., Al Hallak M. N., Sukari A., Nagasaka M., *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)*, **12**, 103-114 (2021).
- 50) <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139508-SLC46A3/tissue+cell+type>.
- 51) Kim J. H., Matsubara T., Lee J., Fenollar-Ferrer C., Han K., Kim D., Jia S., Chang C. J., Yang H., Nagano T., Krausz K. W., Yim S. H., Gonzalez

- F. J., *Nature communications*, **12**, 290 (2021).
- 52) Zhao Q., Zheng B., Meng S., Xu Y., Guo J., Chen L. J., Xiao J., Zhang W., Tan Z. R., Tang J., Chen L., Chen Y., *Biomed. Pharmacother.*, **114**, 108864 (2019).
- 53) Tomabechi R., Miyasato M., Sato T., Takada T., Higuchi K., Kishimoto H., Shirasaka Y., Inoue K., *Mol. Pharm.*, **20**, 491-499 (2023).
- 54) Gillooly J. F., Hein A., Damiani R., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a019091 (2015).
- 55) Derendorf H., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **55**, 106007 (2020).
- 56) Funk R. S., Krise J. P., *Mol. Pharm.*, **9**, 1384-1395 (2012).
- 57) Rutland J., Berend N., Marlin G. E., *Br J Clin Pharmacol*, **8**, 343-347 (1979).
- 58) Gordon R. C., Regamey C., Kirby W. M., *J Pharm Sci*, **62**, 1074-1077 (1973).
- 59) Chow M. S., Ronfeld R. A., *J Clin Pharmacol*, **15**, 405-418 (1975).
- 60) Chu S. Y., Deaton R., Cavanaugh J., *Antimicrob Agents Chemother*, **36**, 1147-1150 (1992).
- 61) Frascini F., Scaglione F., Demartini G., *Clin Pharmacokinet*, **25**, 189-204 (1993).
- 62) Zeitlinger M., Wagner C. C., Heinisch B., *Clin Pharmacokinet*, **48**, 23-38 (2009).
- 63) Puri S. K., Lassman H. B., *J Antimicrob Chemother*, **20 Suppl B**, 89-100 (1987).
- 64) Nilsen O. G., *Infection*, **23 Suppl 1**, S5-9 (1995).
- 65) Parnham M. J., Erakovic Haber V., Giamarellos-Bourboulis E. J., Perletti G., Verleden G. M., Vos R., *Pharmacol Ther*, **143**, 225-245 (2014).
- 66) Wildfeuer A., Laufen H., Leitold M., Zimmermann T., *J. Antimicrob. Chemother.*, **31 Suppl E**, 51-56 (1993).
- 67) Periti P., Mazzei T., Mini E., Novelli A., *Clin Pharmacokinet*, **16**, 193-214 (1989).
- 68) Zhanel G. G., Hartel E., Adam H., Zelenitsky S., Zhanel M. A., Golden A., Schweizer F., Gorityala B., Lagacé-Wiens P. R., Walkty A. J., Gin A. S., Hoban D. J., Lynch J. P., 3rd, Karlowsky J. A., *Drugs*, **76**, 1737-1757 (2016).
- 69) Hand W. L., Hand D. L., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **18**, 419-425 (2001).
- 70) Korolenko T. A., Johnston T. P., Vetvicka V., *Molecules*, **25** (2020).

- 71) Zheng S., Matzneller P., Zeitlinger M., Schmidt S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 6675-6684 (2014).
- 72) de Duve C., de Barsy T., Poole B., Trouet A., Tulkens P., Van Hoof F., *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2495-2531 (1974).
- 73) Wang H., Wang W., Xu Y., Yang Y., Chen X., Quan H., Lou L., *Cancer Sci.*, **108**, 1458-1468 (2017).
- 74) Takano N., Hiramoto M., Yamada Y., Kokuba H., Tokuhisa M., Hino H., Miyazawa K., *Br. J. Cancer*, **128**, 1838-1849 (2023).
- 75) 伊藤 嘉., 福永 正., 須田 健., 平崎 憲., 鷺尾 真., *順天堂医学*, **58**, 334-339 (2012).
- 76) Villamil Giraldo A. M., Appelqvist H., Ederth T., Öllinger K., *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1460-1464 (2014).
- 77) Adams P. C., Holt D. W., Storey G. C., Morley A. R., Callaghan J., Campbell R. W., *Circulation*, **72**, 1064-1075 (1985).
- 78) Hinkovska-Galcheva V., Treadwell T., Shillingford J. M., Lee A., Abe A., Tesmer J. J. G., Shayman J. A., *J. Lipid Res.*, **62**, 100089 (2021).
- 79) Kawabata M., Hirao K., Hachiya H., Higuchi K., Tanaka Y., Yagishita A., Inaba O., Isobe M., *J. Cardiol.*, **58**, 108-115 (2011).
- 80) Rawat P. S., Jaiswal A., Khurana A., Bhatti J. S., Navik U., *Biomed. Pharmacother.*, **139**, 111708 (2021).
- 81) Lien E. A., Solheim E., Ueland P. M., *Cancer Res.*, **51**, 4837-4844 (1991).
- 82) Boland R., Heemskerk M. T., Forn-Cuní G., Korbee C. J., Walburg K. V., Esselink J. J., Carvalho Dos Santos C., de Waal A. M., van der Hoeven D. C. M., van der Sar E., de Ries A. S., Xie J., Spaink H. P., van der Vaart M., Haks M. C., Meijer A. H., Ottenhoff T. H. M., *mBio*, **14**, e0302422 (2023).
- 83) Hultsch S., Kankainen M., Paavolainen L., Kovanen R. M., Ikonen E., Kangaspeska S., Pietiäinen V., Kallioniemi O., *BMC Cancer*, **18**, 850 (2018).
- 84) Barnadas A., Estévez L. G., Lluch-Hernández A., Rodriguez-Lescure A., Rodriguez-Sanchez C., Sanchez-Rovira P., *Adv. Ther.*, **28**, 1045-1058 (2011).
- 85) Rimawi M., Ferrero J. M., de la Haba-Rodriguez J., Poole C., De Placido S., Osborne C. K., Hegg R., Easton V., Wohlfarth C., Arpino G., *J. Clin. Oncol.*, **36**, 2826-2835 (2018).
- 86) Hales C. M., Servais J., Martin C. B., Kohen D., *NCHS data brief*, 1-8 (2019).

- 87) Roche V. F., *Am. J. Pharm. Educ.*, **70**, 101 (2006).
- 88) Lee W. P., *J. Chin. Med. Assoc.*, **85**, 915-921 (2022).
- 89) Luciani F., Spada M., De Milito A., Molinari A., Rivoltini L., Montinaro A., Marra M., Lugini L., Logozzi M., Lozupone F., Federici C., Iessi E., Parmiani G., Arancia G., Belardelli F., Fais S., *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 1702-1713 (2004).
- 90) Liu W., Baker S. S., Trinidad J., Burlingame A. L., Baker R. D., Forte J. G., Virtuoso L. P., Egilmez N. K., Zhu L., *J. Gastroenterol.*, **48**, 1343-1352 (2013).
- 91) Chalmers J. D., Boersma W., Lonergan M., Jayaram L., Crichton M. L., Karalus N., Taylor S. L., Martin M. L., Burr L. D., Wong C., Altenburg J., *The Lancet. Respiratory medicine*, **7**, 845-854 (2019).
- 92) Nichols D. P., Odem-Davis K., Cogen J. D., Goss C. H., Ren C. L., Skalland M., Somayaji R., Heltshe S. L., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **201**, 430-437 (2020).
- 93) Stransky L., Cotter K., Forgac M., *Physiol. Rev.*, **96**, 1071-1091 (2016).
- 94) Ording A. G., Cronin-Fenton D. P., Jacobsen J. B., Nørgaard M., Thomsen R. W., Christiansen P., Søgaard M., *Clin. Epidemiol.*, **5**, 39-46 (2013).
- 95) Möhl A., Orban E., Jung A. Y., Behrens S., Obi N., Chang-Claude J., Becher H., *Cancer*, **127**, 1154-1160 (2021).
- 96) Jordan J. H., Thwin S. S., Lash T. L., Buist D. S., Field T. S., Haque R., Pawloski P. A., Petersen H. V., Prout M. N., Quinn V. P., Yood M. U., Silliman R. A., Geiger A. M., *Breast Cancer Res. Treat.*, **146**, 401-409 (2014).
- 97) Koczwara B., Meng R., Battersby M., Mangoni A. A., Spence D., Lawn S., *Support. Care Cancer*, **31**, 212 (2023).
- 98) Charlson M. E., Pompei P., Ales K. L., MacKenzie C. R., *J. Chronic Dis.*, **40**, 373-383 (1987).
- 99) Mosholder A. D., Mathew J., Alexander J. J., Smith H., Nambiar S., *N. Engl. J. Med.*, **368**, 1665-1668 (2013).
- 100) Giudicessi J. R., Ackerman M. J., *Cleve. Clin. J. Med.*, **80**, 539-544 (2013).
- 101) Heer E., Harper A., Escandor N., Sung H., McCormack V., Fidler-Benaoudia M. M., *The Lancet. Global health*, **8**, e1027-e1037 (2020).