

氏名（本籍）	<small>きよみや けいすけ</small> 清宮 啓介（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 338 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 15 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	医薬品と抗体薬物複合体（ADC）の相互作用に関する研究
論文審査委員	（主査）教授 井上 勝央 教授 降幡 知己 教授 石原 比呂之

論文内容の要旨

薬物相互作用は、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、事前に回避することが望まれる。薬物動態学的相互作用は、主に薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが関与する薬物相互作用であり、血中濃度の増減を引き起こす。現状、医薬品開発においては、薬物動態学的相互作用のリスクを低減するために、ヒトでの薬物動態の定量的予測が行われている。一方、近年は創薬モダリティの多様化、発展に伴い、核酸医薬品や antibody-drug conjugate (ADC) などの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。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に、リンカーを介してペイロードと呼ばれる殺細胞性低分子化合物を結合させた抗悪性腫瘍薬である。特異的に抗原を認識後、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた ADC はリソソームへ移行し、分解を受けるが、その分解生成物の細胞内動態はリンカーの種類（切断型リンカーもしくは非切断型リンカー）によって異なる。特に、非切断型リンカー型 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。非切断型リンカー型 ADC の一種である trastuzumab emtansine (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。Lys-SMCC-DM1 の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 が同定されたが、そのトランスポーターとしての機能は不明であった。近年では SLC46A3 の発現低下が T-DM1 の耐性機構に関与することや T-DM1 の効果予測のバイオマーカーとなることが報告されている。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。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 (Cla) および erythromycin (Ery) 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。本知見は、T-DM1 を用いた治療において、SLC46A3 の輸送機能を阻害する薬物の併用は T-DM1 の薬効を減弱させる可能性を示唆している。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 との相互作用の重要性を探るため、T-DM1 の薬効に及ぼす各種薬物の影響を検討した。

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

Macrolide・ketolide 系抗菌薬は大環状ラクトン骨格を有する弱塩基性化合物であり、その体内動態特性として優れた細胞内移行性と大きな分布容積が挙げられる。第 1 章では macrolide・ketolide 系抗菌薬が ADC の薬効に及ぼす影響を検討した。

14 員環の Ery、Cla および roxithromycin (Rox)、15 員環の azithromycin (Azi)、16 員環の josamycin (Jos)、ketolide 系抗菌薬 solithromycin (Sol) も含め、計 6 薬物を選択し、KPL-4 細胞を用いて T-DM1 (0.005, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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。0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 Ery、Cla、Rox、Azi、Jos および Sol 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%、31%、26%、64%、18%および 24%まで上昇した。特に T-DM1 と Azi 存在下においては Azi 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 非存在下と同等レベルにまで上昇した (図 1)。また、同様の結果は、HER2 陽性乳癌細胞である HCC1954 細胞においても認められた。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 Azi でその影響が大きいことが示された。

T-DM1 を投与した患者において、T-DM1 より非特異的に遊離された DM1 が血中に検出されることが知られている。そこで、Azi による T-DM1 の薬効減弱効果が DM1

の殺細胞効果への影響による可能性を検討するため、Azi 存在下における DM1 の KPL-4 細胞に対する殺細胞効果を評価した。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、約 40% となり、Azi 共存 (0.1–30 μM) による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、Azi は DM1 の殺細胞効果に影響を与えないことが示された。続いて、Azi が T-DM1 以外の ADC の薬効を減弱させるかを確認するために、trastuzumab deruxtecan (T-DXd) を用いて検討した。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、0.2、1.0 $\mu\text{g/mL}$ T-DXd 存在下における細胞生存率は Azi 濃度依存的な添加による変動を認めなかった。

以上の結果より、macrolide・ketolide 系抗菌薬は T-DM1 の殺細胞効果を減弱し、中でも Azi が最も強力な減弱作用を示すことが明らかとなった。一方、Azi は DM1 および T-DXd の殺細胞効果に影響を及ぼさないことから、macrolide・ketolide 系抗菌薬による DM1 の薬効減弱には DM1 による微小管重合阻害および trastuzumab の内在化・細胞内輸送過程の阻害は関与しないことが示唆された。

第 2 章 SLC46A3 輸送機能阻害の検討

最近の研究において、SLC46A3 の C 末端領域に含まれるリソソーム移行性シグナルを欠如した SLC46A3 (SLC46A3 dC) は、細胞膜に局在し、Lys-SMCC-DM1 および 5-carboxyfluorescein (5-CF) を輸送することが報告されている。そこで、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 dC 発現細胞を用い、SLC46A3 の Lys-SMCC-DM1 および 5-CF 輸送活性に及ぼす macrolide・ketolide 系抗菌薬の効果を評価した。

その結果、第 1 章で検討した各種 macrolide・ketolide 系抗菌薬は SLC46A3 を介した 5-CF の細胞内取り込みを阻害した。その IC_{50} 値は、70.4 μM (Ery)、73.6 μM (Cla)、190 μM (Rox)、514 μM (Azi)、63.7 μM (Jos) および 52.5 μM (Sol) であった (図 2)。中でも Azi の IC_{50} 値は大きく、SLC46A3 に対する阻害能が低いことが示された。そこで、SLC46A3 による

Lys-SMCC-DM1 輸送に対する Azi の阻害効果を確認した結果、その輸送は Azi 1 mM の共存下において 36% に低下した。続いて、Azi の強力な T-DM1 の薬効減弱作用と大きい IC_{50} 値との関連における矛盾の要因を探るため、リソソーム阻害薬である bafilomycin A1 の存在あるいは非存在下における各 macrolide・ketolide 系抗菌薬の細胞内蓄積量を定量し、それらのリソソーム内濃度を推定した。その結果、macrolide・

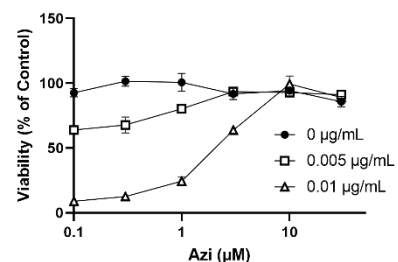


図 1 KPL-4 細胞における T-DM1 の殺細胞効果に対する Azi 曝露の影響

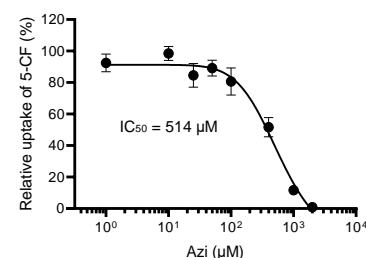


図 2 SLC46A3 の輸送活性に及ぼす Azi の影響

ketolide 系抗菌薬は顕著にリソソームへ集積し、Azi のリソソーム/細胞内蓄積比は 57 倍であった (図 3)。また、ヒト IgG 抗体を用いた免疫蛍光染色により、細胞内に取り込まれた T-DM1 に対する macrolide・ketolide 系抗菌薬の影響を検討した結果、Azi および Sol を曝露した細胞では未分解の trastuzumab が細胞内に検出されたことから、Azi および Sol 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

T-DM1 の薬効に及ぼすリソソーム指向性薬物の影響は macrolide 系抗菌薬を除き検討されていない。そこで、臨床的視点から、リソソーム指向性の高い薬物および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。

Amiodarone および tamoxifen は分布容積が大きく、代表的なリソソーム指向性薬物である。T-DM1 存在下における amiodarone 3 μ M 曝露時の細胞生存率はコントロールの 42.8%となったが、amiodarone 非曝露時の細胞生存率 35.8%に対して有意な変化は認められなかった。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。

以上より、amiodarone および tamoxifen は T-DM1 の薬効には影響を与えないことが示された。

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。臨床で利用されている macrolide・ketolide 系抗菌薬が T-DM1 の薬効を減弱させ、Azi でその影響が最も強いことを示した。Macrolide・ketolide 系抗菌薬は良好なリソソーム移行性を示し、その推定されるリソソーム内濃度は SLC46A3 を顕著に阻害し得るレベルであった。特に Azi はリソソームへの移行が顕著であり、高いリソソーム内濃度となると推定された。さらに trastuzumab に対する免疫染色の結果、Azi および Sol はリソソーム内での 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 の輸送活性阻害に基づく Lys-SMCC-DM1 の細胞質移行性の低下と、リソソーム機能の障害による Lys-SMCC-DM1 の生成低下に寄与することが示唆された。

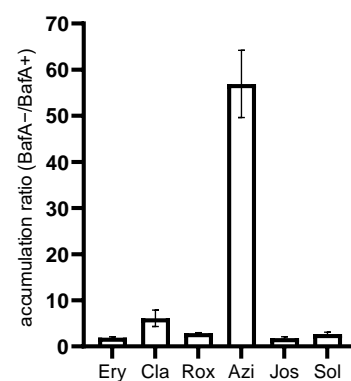


図 3 Macrolide・ketolide 系抗菌薬の蓄積比 (リソソーム/細胞)
BafA: bafilomycin A1

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。

【研究結果の掲載誌】

Keisuke Kiyomiya, Ryuto Tomabechei, Naoki Saito, Kenta Watai, Tappei Takada, Yoshiyuki Shirasaka, Hisanao Kishimoto, Kei Higuchi, and Katsuhisa Inoue, *Molecular Pharmaceutics*, 20, 6130–6139 (2023)

【論文審査の結果の要旨】

本論文は、医薬品と ADC の薬物相互作用の可能性を探るため、HER2 陽性進行再発乳癌に対する ADC として臨床応用されている trastuzumab emtansine (T-DM1) に焦点をあて、リソソーム指向性を有する macrolide・ketolide 系抗菌薬および各種薬物が T-DM1 の薬効へ及ぼす影響について検討したものである。

薬物相互作用は治療の失敗や重篤な有害事象の発生リスクを高めるため、最適な薬物治療を実践するためには、薬物相互作用を予測し、事前に回避することが望まれる。薬物相互作用は薬力学的および薬物動態学的な相互作用に大別され、後者は、薬物の物性や化学構造に基づき、薬物動態に関わる物理化学的変化やタンパク質との相互作用を伴うため、薬効から相互作用リスクを予測することは困難とされている。そのため、医薬品開発の初期段階では、主要な相互作用の標的となる代謝酵素や薬物トランスポーターに対する医薬品候補化合物の阻害試験等が実施され、相互作用リスクの定量的予測が行われている。一方、近年では多様な創薬モダリティが開発されているが、それらについては、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ほとんどなされていない。

ADC は、癌細胞を標的とする抗体医薬に、リンカーを介して強力な殺細胞性化合物（ペイロード）を結合させた抗悪性腫瘍薬であり、その薬効発現にはエンドサイトーシスを介したリソソームへの移行と分解を伴う。T-DM1 の薬効発現においては、T-DM1 の分解を経て生成された Lys-SMCC-DM1 のリソソーム内から細胞質への移行が重要であり、その移行はリソソーム膜トランスポーターである SLC46A3 が媒介することが示されている。したがって、多剤の併用により、リソソーム内の環境や SLC46A3 を含むリソソームタンパク質の機能が変化する場合、ADC の薬効が減弱する可能性が考えられる。先行研究において、リソソーム指向性を有する代表的な医薬品のなかで、clarithromycin、erythromycin および rifabutin が SLC46A3 の輸送活性を阻害し、T-DM1 の薬効を低下させることが示されている。

本背景のもと、申請者は、医薬品と ADC の相互作用の重要性を探るため、各種薬物が T-DM1 の薬効へ及ぼす影響を検討し、新たな知見を 3 章にまとめている。

第 1 章では、代表的なリソソーム指向性を持つ 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、臨床応用されている macrolide 系抗菌薬および ketolide 系抗菌薬が HER2 陽性乳がん細胞に対する T-DM1 の殺細胞効果を顕著に減弱させ、特に azithromycin でその影響が大きいことを明らかにしている。この azithromycin の効果は、同じ IgG により標的化される trastuzumab deruxtecan で認められないことから、ADC の内在化過程ではなく、ペイロードの細胞質への移行過程にあると考察している。

第 2 章では、macrolide・ketolide 系抗菌薬による T-DM1 の薬効減弱効果の分子機構の解明に取り組み、macrolide・ketolide 系抗菌薬がリソソーム内に高度に蓄積し、SLC46A3 の輸送機能を阻害することを明らかにしている。特に、第 1 章で最も強力に

T-DM1 の薬効を減弱した azithromycin は、他の macrolide・ketolide 系抗菌薬に比較して、SLC46A3 輸送活性に対する阻害能は小さいものの、リソソームへの集積能は最大であった。また、T-DM1 の分解は azithromycin 共存下において抑制されることが示された。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考察している。

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。不整脈治療薬である amiodarone およびホルモン受容体陽性乳癌に用いられる tamoxifen は、T-DM1 との併用が想定されるリソソーム指向性が高い薬物であるが、T-DM1 の殺細胞効果に影響を及ぼさないことが示された。また、リソソーム内の酸性化に寄与する液胞型 ATPase に対する阻害活性を有する proton pump inhibitors は、高濃度域では SLC46A3 の輸送活性を阻害したが、低濃度域では T-DM1 の薬効に影響を及ぼさなかった。したがって、T-DM1 の薬効を減弱する薬剤は、リソソーム指向性だけでなく、SLC46A3 やリソソーム機能を阻害する性質を有することが示唆された。

以上の結果より、macrolide・ketolide 系抗菌薬と T-DM1 の併用は T-DM1 の薬効を減弱する可能性が示された。Macrolide 系抗菌薬が抗炎症効果に基づき長期投与されることや、がん組織においてリソソーム pH が低下していることから、macrolide 系抗菌薬と T-DM1 との薬物相互作用は臨床において十分起こり得ると考察されている。

以上の研究成果は、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、ADC 治療の最適化や効率的な ADC 開発に繋がるものと期待される。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。