

博士学位論文

リソソーム膜タンパク質 SLC46A3 の機能解明および  
ADC 治療への応用に関する研究

苔米地 隆人

東京薬科大学大学院薬学研究科

*Studies on the functional identification of lysosomal membrane protein SLC46A3 and its potential application to ADC therapy*

*Ryuto Tomabechi*

Ph.D. Thesis

*Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*

## 目次

略語一覧	3
序論	4
<b>第 1 章 リソソーム膜タンパク質 SLC46A3 の機能同定</b>	<b>9</b>
第 1 節 細胞膜発現 SLC46A3 変異体の作製	11
第 2 節 SLC46A3 内因性基質の同定および輸送特性評価	15
第 3 節 SLC46A3 dC 介在性 EIS 取り込みに対する様々な内因性化合物 の影響	19
第 4 節 考察	24
第 5 節 小括	26
<b>第 2 章 T-DM1 薬効発現における SLC46A3 の役割の解明</b>	<b>27</b>
第 1 節 SLC46A3 の Lys-SMCC-DM1 トランスポーターとしての機能 同定	28
第 2 節 SLC46A3 阻害剤の探索	30
第 3 節 T-DM1 の殺細胞効果に対する SLC46A3 阻害剤の影響	34
第 4 節 T-DM1 分解過程に対する lysosomotropic drugs の影響	38
第 5 節 考察	39
第 6 節 小括	40
<b>第 3 章 SLC46A3 の蛍光基質の同定および SLC46A3 基質/阻害剤探索へ の応用</b>	<b>41</b>
第 1 節 SLC46A3 の新規蛍光基質の同定	42
第 2 節 SLC46A3 dC 介在性 5-CF 輸送特性の評価	44
第 3 節 SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みに対する既知 SLC46A3 基質 /阻害剤の影響	46
第 4 節 5-CF を用いた輸送評価による SLC46A3 の新規基質の同定	49
第 5 節 考察	51
第 6 節 小括	53
総括	54
実験の部	56
掲載論文	74
謝辞	75
引用文献	76

## 略語一覽

略語	名称
5-AF	5-aminofluorescein
6-AF	6-aminofluorescein
ADC	antibody-drug conjugate
5-CF	5-carboxyfluorescein
6-CF	6-carboxyfluorescein
DBF	4,5-dibromofluorescein
DCF	2,7-dichlorofluorescein
DDS	drug delivery system
DM1	<i>N</i> <sup>2'</sup> -deacetyl- <i>N</i> <sup>2'</sup> -(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine
E <sub>1</sub> S	estrone 3-sulfate
FDA	Food and Drug Administration
FL	fluorescein
HBSS	Hank's balanced salt solution
HER2	human epidermal growth factor receptor type2
Lys-SMCC-DM1	lysine- <i>N</i> <sup>ε</sup> - <i>N</i> -succinimidyl 4-( <i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate-DM1
MDCK	Mardin–Darby canine kidney
MMAE	monomethyl auristatin E
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
PBD	pyrrolobenzodiazepine
Rh123	rhodamine 123
Rh110	rhodamine 110
SF	sulfonylfluorescein
SMCC	<i>N</i> -succinimidyl 4-( <i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1- carboxylate
SR101	sulforhodamine 101
5-TAMRA	5-carboxytetramethylrhodamine
T-DM1	trastuzumab emtansine

## 序論

創薬モダリティは過去数十年の間に、低分子医薬品から様々なバイオ医薬品へと多様化してきた<sup>1-3)</sup>。1982年にインスリン製剤が上市されて以来、サイトカイン製剤やホルモン製剤、酵素、抗体医薬品などがバイオ医薬品として使用されている。低分子医薬品からバイオ医薬品への変遷は目覚ましく、医薬品上市品目におけるバイオ医薬品の占有率は、1990年では26%であったのに対し、2010年には50%にまで増加している。また、売上高の年次推移においても、低分子医薬品は2011年をピークにほぼ横ばいであるのに対し、バイオ医薬品は2000年以降も増加し続けている。その全売上に対する割合は、2020年では低分子医薬品が54%、バイオ医薬品が38%となっており、特に抗体医薬品がその多くを占めている。さらに最近、抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC) や核酸医薬品、細胞治療などの新たな創薬モダリティが次々に台頭してきている。これら創薬モダリティの実用例は多くはないものの、開発パイプライン数は急激に上昇しており、今後多くの医薬品が上市されると予想される<sup>1)</sup>。一方、創薬標的分子も多様化しており、タンパク質間相互作用が注目を浴びている。タンパク質間相互作用を標的とした医薬品はシクロスポリン (シクロフィリン/カルシニューリン) やピブレンタスビル (C型肝炎ウイルス NS5A 複製複合体) などが知られている。タンパク質同士の相互作用面は、酵素などとは異なり、比較的平面で広い。したがって、分子量が500未満の低分子化合物は結合しにくく、抗体などの高分子が有利である。細胞外のタンパク質間相互作用はタンパク質製剤や抗体医薬品で対応できる一方、細胞内タンパク質間相互作用は生体膜透過性や特異性の観点から、従来の低分子医薬品やバイオ医薬品では不十分である。近年、中分子医薬品が注目を浴びており、細胞内タンパク質間相互作用を標的とした創薬モダリティとして、今後実用化が進んでいくと予想される。

創薬モダリティの多様化に伴い、様々な薬物送達システム (drug delivery system: DDS) が研究されており、近年、エンドサイトーシス経路が注目を浴びている。エンドサイトーシスとは、細胞膜上のタンパク質、脂質および細胞外の物質を細胞内へ取り込む機構であり、細胞膜上での小胞形成とそれに続く細胞内小胞輸送からなる<sup>4)</sup>。細胞内に取り込まれる物質 (cargo) を含む小胞は、エンドサイトーシスにより内在化された後、初期エンドソームへと輸送され、一部は再び細胞外へ送り返されるが、一般的には後期エンドソームを経てリソソームに移行する。リソソーム内腔は酸性に保たれており、酸性条件で機能する様々な加水分解酵素を含んでいるため<sup>5,6)</sup>、エンドサイトーシスされた物質の多くはリソソームで分解される。このような分解経路を利用し、細胞外からのアミノ酸や脂質などの栄養素の獲得を行っている。また、リソソームは、マクロファージや樹状細胞のような抗原提示細胞においても重要な役割を果たしており、細胞外からエンド

サイトーシスにより取り込んだ異物を分解し、ペプチド断片を MHC クラス II 分子と会合させて細胞膜へ提示することでヘルパーT 細胞の免疫応答を開始させる。

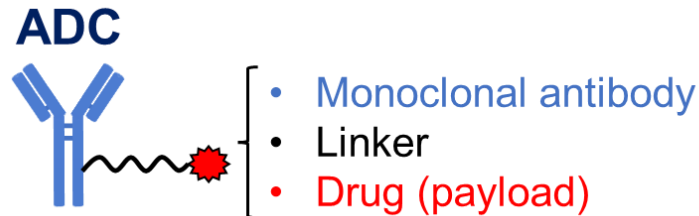


Fig. 1. Structure of ADC.

エンドサイトーシス経路を活用した創薬モダリティとして ADC が挙げられる。ADC はモノクローナル抗体、毒性の高い薬物 (payload) およびこれらを結合させるためのリンカーで構成されており (Fig. 1)、がん細胞特異的な薬物送達を可能とした抗がん剤である。現在、12 種の ADC がアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) により承認されており、非常に多くの候補 ADC が臨床試験段階に入っている<sup>7)</sup>。ADC は細胞表面の抗原に結合後、エンドサイトーシスにより内在化され、エンドソームおよびリソソームに移行する<sup>8)</sup>。そこで、モノクローナル抗体あるいはリンカーが分解され、payload を放出し、payload が標的である DNA や微小管等に作用することで殺細胞効果を発揮する (Fig. 2)。

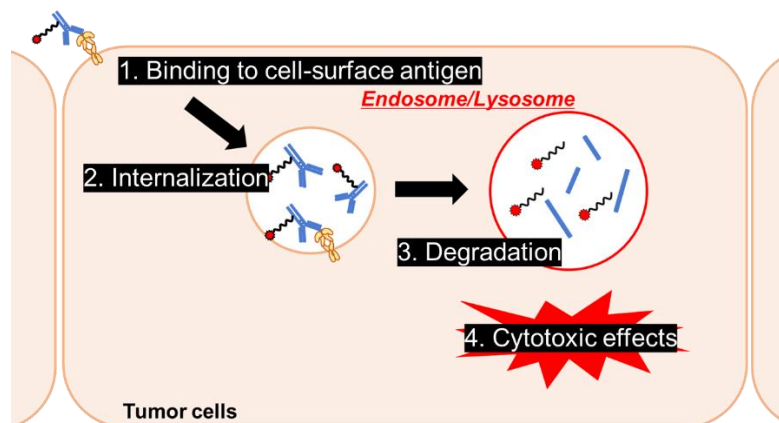


Fig. 2. Intracellular dynamics of ADC.

ADC を構成するリンカーは、ADC の安定性や薬物動態学的および薬力学的特性を決定する重要な要素であり、切断型と非切断型に大別される<sup>9,10)</sup>。切断型リンカーは pH やグルタチオン濃度などの細胞内外の環境の違いやリソソーム酵素に反応して切断され、payload を放出する。臨床応用されている payload の多くは脂溶性が高いため、遊離した payload は高い生体膜透過性を有し、容易に細胞質

内へ移行し、標的に作用する。さらに、その高い生体膜透過性から、周囲のがん細胞にも到達し、殺細胞効果を発揮するバスタンダー効果が期待できる。一方、非切断型リンカーは分解酵素に対して抵抗性を有し、切断型リンカーよりも安定性が高い。非切断型リンカーADCは、リソソームに到達後、モノクローナル抗体部分が分解され、最終的に抗体由来のアミノ酸残基およびリンカーが結合した payload (modified payload) を放出する。遊離した modified payload は比較的高い分子量と水溶性を有し、生体膜透過性が低い。したがって、標的細胞でのみ作用し、バスタンダー効果は惹起されない。

Trastuzumab emtansine (T-DM1) は臨床応用されている非切断型リンカーADCであり、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (human epidermal growth factor receptor type2: HER2) に対するヒト化抗体である trastuzumab、強力なチューブリン阻害剤である *N*<sup>2</sup>-deacetyl-*N*<sup>2</sup>-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine (DM1) および非切断型チオエーテルリンカーである *N*-succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) により構成されている<sup>11,12)</sup>。T-DM1 は HER2 に結合後、受容体介在性エンドサイトーシスにより内在化され、リソソームに移行する。リソソームに移行後、分解され、リジンおよび SMCC リンカーが payload に結合した lysine-*N*<sup>ε</sup>-*N*-succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate-DM1 (Lys-SMCC-DM1) を遊離する。Lys-SMCC-DM1 はチューブリンに作用し、重合を阻害することで細胞死を引き起こす。T-DM1 は trastuzumab や lapatinib に抵抗性を有する HER2 陽性乳がんに対して有効性を示すことが、培養細胞系およびマウス皮下異種移植腫瘍モデルを用いた研究により明らかになっている<sup>11,13,14)</sup>。さらに、trastuzumab およびタキサン系薬剤の治療歴を有する HER2 陽性進行・再発乳がん患者を対象とした第Ⅲ相試験において、T-DM1 は対照群 (capecitabine + lapatinib) に対し、主要評価項目である無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) を有意に延長し、T-DM1 と対照群の PFS 中央値はそれぞれ 9.6 ヶ月および 6.4 ヶ月、OS 中央値はそれぞれ 30.9 ヶ月および 25.1 ヶ月であった<sup>15)</sup>。さらに、副次評価項目である奏効率は、T-DM1 群で 43.6%、対照群で 30.8%であった。このように臨床試験においても有効性が示され、現在、T-DM1 は HER2 陽性転移性乳がんの治療薬として、世界的に広く使用されている。

T-DM1 の有効性が示されている一方、その細胞内動態制御機構については不明な点が多い。リソソームにおいて遊離した Lys-SMCC-DM1 は、リンカーおよびリジンが結合していることから、分子量が大きく、比較的水溶性が高いため、生体膜透過性が極めて低い<sup>16)</sup>。したがって、T-DM1 が薬効を発揮するためには、Lys-SMCC-DM1 がリソソームから細胞質へ効率的に移行するための特殊な膜透過機構が関与すると予想されるが、未だ詳細なメカニズムは明らかになっていない。

リソソームにおける低分子化合物の膜透過機構にはトランスポーターが関わっている。トランスポーターは、生体膜を介して細胞内外の物質輸送を担う膜タン

パク質であり、糖やアミノ酸、ビタミンなど様々な低分子化合物を輸送することで生命活動の維持に寄与している<sup>17)</sup>。また、様々な病態形成に関わっており、治療標的となっている<sup>18-20)</sup>。一方、いくつかの細胞膜トランスポーターは、内因性化合物だけでなく、薬物のような外因性化合物を輸送することが知られており、医薬品の薬物動態特性を決定づける重要な因子である<sup>21)</sup>。リソソーム膜にも同様にトランスポーターが存在し、エンドサイトーシスにより取り込んだ物質やオートファジーにより隔離した不要なタンパク質のリソソーム最終分解産物を細胞質へ輸送することで、物質の再利用に関わっている<sup>22)</sup>。また、近年、リソソームの分解経路としての役割に加え、細胞内の栄養状態の感知に関わる細胞内シグナリングや代謝物の貯蔵庫としての役割も提唱されており、そこではリソソームトランスポーターが重要な役割を担っている<sup>23,24)</sup>。これまでに、糖、アミノ酸、ペプチド、ヌクレオシド、ビタミン、金属イオン、リン脂質、ポリアミンなどの内因性化合物をリソソーム内外へ輸送するトランスポーターが数多く報告されている<sup>25-34)</sup>。一方、リソソームにおける薬物トランスポーターに関する報告は少なく、多剤トランスポーターである **P-gp** が一部リソソームに発現しており、抗がん剤の細胞質からリソソームへの輸送を担うことで、がん細胞の多剤耐性に関わっていることが報告されている<sup>35)</sup>。

リソソームにおける高分子化合物の膜透過機構に関して、DNA および RNA の膜透過に関わる分子として **SIDT2** が報告されている<sup>36)</sup>。DNA および RNA のリソソーム分解機構である **DNautophagy/RNautophagy** において、**SIDT2** は細胞質の DNA および RNA をリソソーム内へ輸送する役割を担っている。また、リソソーム膜タンパク質である **LAMP2A** は、ある特定のタンパク質をリソソームへ直接輸送することが知られている<sup>37)</sup>。しかし、いずれもその輸送方向性は細胞質からリソソームであり、リソソームから細胞質への高分子化合物の膜透過機構は不明である。

**T-DM1** 治療に対する耐性化メカニズムは、**T-DM1** の細胞内動態制御機構を理解する上で重要である。**HER2** 発現量の低下は **trastuzumab** の耐性化メカニズムとして知られている<sup>38)</sup>。**T-DM1** においても **HER2** 発現量の低下により、耐性を示すことが知られており、**HER2** への結合と内在化の阻害により、**trastuzumab** 依存的な抗がん活性だけでなく、**Lys-SMCC-DM1** の放出と細胞毒性が制限される<sup>39)</sup>。また、**HER2-trastuzumab** 複合体の内在化と分解は、エンドサイトーシスの足場タンパク質である **endophilin A2** によって制御され、**endophilin A2** をコードする **SH3GL1** のノックダウンにより、**T-DM1** の殺細胞効果が低下することが報告されている<sup>40)</sup>。さらに、リソソーム **pH** の上昇とそれに伴うリソソーム酵素活性の低下、小胞輸送に関わる分子や薬剤排出トランスポーターなどが耐性化因子として示唆されている<sup>41-45)</sup>。近年、**T-DM1** に抵抗性を示すがん細胞において、リソソームオーファントランスポーターである **SLC46A3** の発現量が低下していることが報告され、



さらに T-DM1 の殺細胞効果は SLC46A3 のノックダウンによっても減少することから、SLC46A3 は T-DM1 の薬効発現に重要な遺伝子であることが示された<sup>46,47)</sup>。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明である。

T-DM1 の細胞内動態において、リソソームオーファントランスポーターである SLC46A3 が payload の細胞質への膜透過過程を制御している可能性が考えられるが、本過程における SLC46A3 の役割に関する研究はほとんどなされていない。したがって、本研究では、T-DM1 細胞内動態における SLC46A3 の役割の解明および ADC 治療の最適化を目的とし、SLC46A3 の機能同定に関する検討を行った。

第 1 章では、T-DM1 の薬効に関連するリソソームオーファントランスポーター SLC46A3 が有機アニオントランスポーターであると仮説を立て、SLC46A3 機能評価のための細胞株の樹立、分子機能および生理的基質の同定を試みた。

第 2 章では、SLC46A3 の輸送体としての機能に着目し、T-DM1 の薬効発現における SLC46A3 の役割に関する検討を行った。

第 3 章では、SLC46A3 の迅速かつ簡便な機能評価方法の確立を目的として、蛍光プローブに着目し、SLC46A3 の蛍光基質の探索を行った。

## 第 1 章 リソソーム膜タンパク質 SLC46A3 の機能同定

ADC は抗体の特異性を利用し、正常細胞に対する毒性を回避しながら、がん細胞に薬物を送達することが可能な次世代抗体医薬品である。ADC は、1) がん細胞表面抗原への結合、2) エンドサイトーシスによる内在化、3) エンドソームおよびリソソームへの移行、4) payload の遊離、5) 標的への作用、の複数の過程を経て薬効を発揮する<sup>8)</sup>。ADC の内在化過程が共通して payload 放出の律速段階である一方、リンカー部分の違いにより、その後の細胞内動態が異なる。切断型リンカーADC は内在化後、エンドソームあるいはリソソームで分解され payload を遊離する。ADC に使用される payload は生体膜透過性が高いため、容易にリソソームから細胞質へ拡散する。一方、非切断型リンカーADC は、リンカー部分が分解されないため、最終的な ADC 分解産物として、アミノ酸とリンカーが結合した payload を遊離する。本分解産物は、通常の payload と比較して分子量と水溶性が高く、生体膜透過性が低い<sup>16,48)</sup>。

非切断型リンカーADC である T-DM1 は、HER2 陽性転移性乳がんの治療に使用される抗がん剤であり、2013 年に FDA により承認されて以来、臨床現場で広く使用されている。T-DM1 は、HER2 に対するモノクローナル抗体、非切断型リンカーである SMCC、およびチューブリン阻害剤である DM1 で構成されており、リソソームにおいて Lys-SMCC-DM1 を遊離する (Fig. 3)。近年、shRNA スクリーニングより、T-DM1 の薬効発現に重要な遺伝子として SLC46A3 が同定され、SLC46A3 のノックダウンが T-DM1 の有効性と Lys-SMCC-DM1 のリソソーム内蓄積量を変化させることが報告された<sup>47)</sup>。さらに最近、SLC46A3 の発現量が T-DM1 の治療抵抗性に関連し、T-DM1 投与患者の予後バイオマーカーとして関与することが報告されている<sup>44,46,49)</sup>。これらの報告は、T-DM1 治療における SLC46A3 の重要性を支持しているが、T-DM1 薬効発現における SLC46A3 の役割は不明である。

SLC46A3 は SLC46A ファミリーに属するオーファントランスポーターであり、同ファミリーに属する SLC46A1 は葉酸トランスポーター (proton-coupled folate transporter: PCFT) としてよく知られている<sup>50)</sup>。これまでに、詳細な分子メカニズムは不明であるものの、SLC46A3 が肝臓がん細胞の増悪抑制因子であることや、肝臓における銅ホメオスタシスと脂質代謝に関わることが知られている<sup>51,52)</sup>。最近、がん細胞における脂質ナノ粒子の細胞内取り込みが SLC46A3 の発現量と逆相関を示すことが報告され、機序不明であるものの、SLC46A3 がエンドサイトーシス経路を制御することが示唆されている<sup>53)</sup>。したがって、SLC46A3 の輸送基質がエンドサイトーシス経路ひいては T-DM1 薬効発現を制御すると予想されるが、SLC46A3 の分子機能および生理的基質は未だ明らかになっていない。

SLC46A3 が SLC46A1 と相同性を有することを考慮すると、SLC46A3 が有機ア

ニオントランスポーターとして機能する可能性が推察される。したがって、本研究では、SLC46A3 が有機アニオントランスポーターであると仮説を立て、SLC46A3 機能評価のための細胞株を作製し、SLC46A3 の分子機能および生理的基質の同定を試みた。

## 第 1 節 細胞膜発現 SLC46A3 変異体の作製

リソソームタンパク質は、チロシンモチーフやジロイシンモチーフのようなリソソーム移行シグナルをしばしば有する<sup>54)</sup>。SLC46A3 がこのようなシグナル配列を有するか調べるために、ClustalW program (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を使用して、SLC46A3 の一次構造を解析した。その結果、チロシンモチーフ (YXXΦ、Φ は疎水性アミノ酸残基) に相当するアミノ酸配列 YELL (Y446–L449) をヒト SLC46A3 の C 末端領域に有することが明らかとなった。同様のアミノ酸配列が他の哺乳類においても確認されたことから、本シグナル配列が動物種間で保存されていることが示唆された (Fig. 3)。

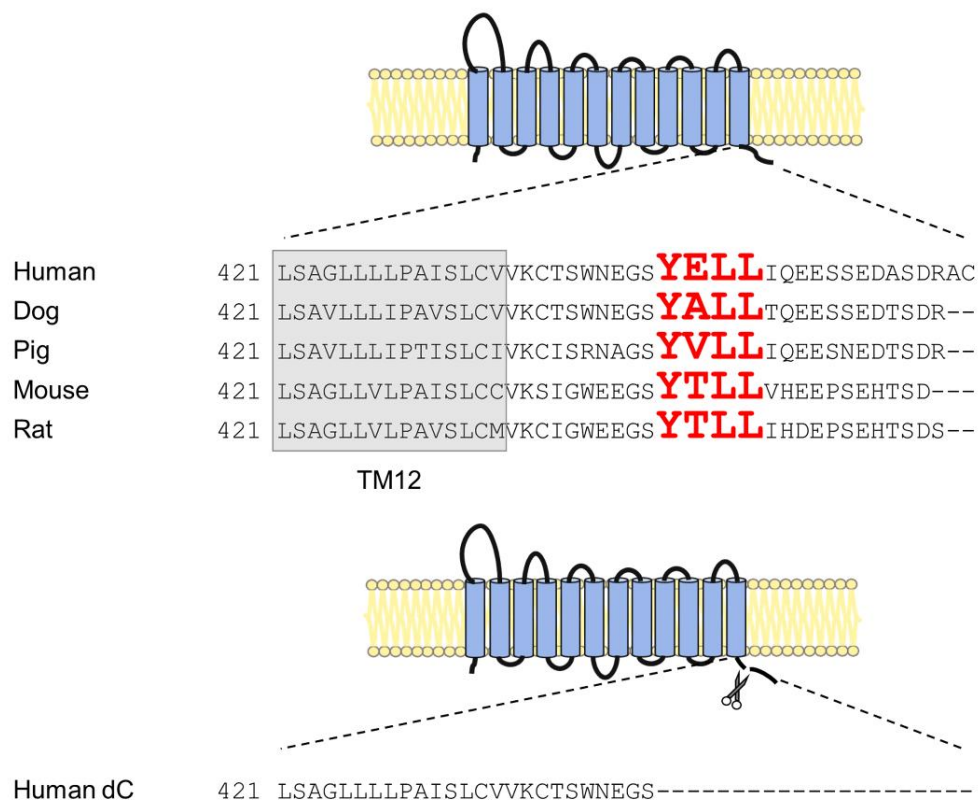


Fig. 3. Mammalian SLC46A3 shares a lysosomal-sorting motif in its C-terminal region. Predicted membrane topology of SLC46A3 by TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) and sequence alignment of its C-terminal region between mammalian species. The sequences predicted as tyrosine-based lysosomal-sorting motifs are shown with red color characters. Human dC is a C-terminal amino acid sequence deleted in SLC46A3 mutants in this study.

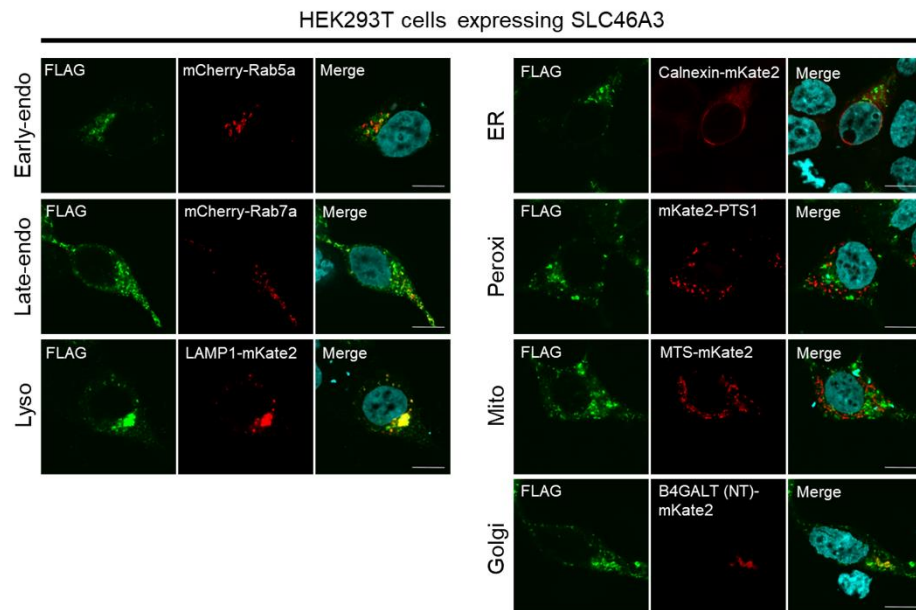
SLC46A3 の細胞内局在を確認するために、FLAG-tagged SLC46A3 を一過性発現させた HEK293T 細胞を用いて、FLAG に対する蛍光免疫染色を行い、細胞内オルガネラマーカールとの共局在を観察した (Fig. 4A)。SLC46A3 は主にリソソームマーカである LAMP1-mKate2 と共局在し、一部、初期エンドソームマーカである mCherry-Rab5a、後期エンドソームマーカである mCherry-Rab7a およびゴルジマーカである B4GALT (NT)-mKate2 と共局在した。対照的に、SLC46A3 は ER マーカである calnexin-mKate2 やペルオキシソームマーカである mKate2-PTS1、ミトコンドリアマーカである MTS-mKate2 とほとんど共局在しなかった。これらの結果は、SLC46A3 が主にリソソームに局在していることを示している。

次に、SLC46A3 を細胞膜へ局在化させるために、YELL を含む C 末端領域を欠損させたヒト SLC46A3 変異体 (SLC46A3 dC) を作製した (Fig. 3)。蛍光免疫染色によりその細胞内局在を検討したところ、SLC46A3 dC は細胞膜に局在することが明らかとなった (Fig. 4B)。一方、一部の細胞内 SLC46A3 dC が Rab7a および LAMP1 と共局在していることから、SLC46A3 dC のアミノ酸配列中にエンドソームおよびリソソーム移行シグナルが存在することが示唆された。

さらに、446 番目のチロシンと 449 番目のロイシンをアラニンに置換した SLC46A3 (SLC46A3 [AELA]) を作製し、その局在を観察した結果、SLC46A3 dC と同様に細胞膜に局在した (Fig. 5)。

以降の実験のために、内因性トランスポーターによる細胞内取り込み活性が低い Madin-Darby canine kidney II (MDCKII) 細胞を選択し、SLC46A3 dC 安定発現 MDCKII (MDCKII/SLC46A3 dC) 細胞を作製した。また、蛍光免疫染色により、MDCKII 細胞においても SLC46A3 dC が細胞膜上に発現することを確認した (Fig. 6)。

A



B

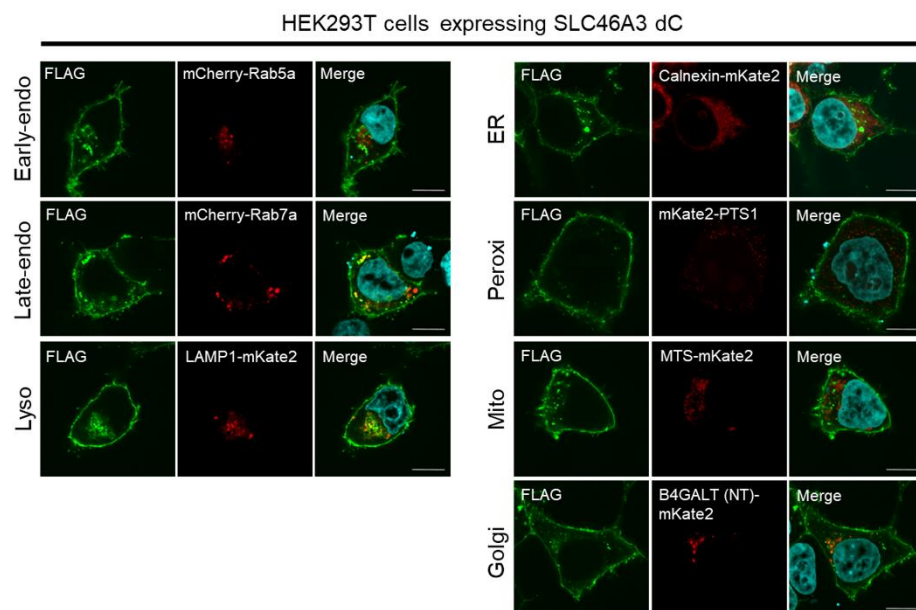


Fig. 4. SLC46A3 dC mainly localizes to the plasma membrane. Immunofluorescence staining of FLAG-tagged SLC46A3 (green) in transfected cells by anti-FLAG antibody. HEK293T cells were transfected with 3×FLAG-tagged (A) wild-type human SLC46A3 or (B) C-terminal deleted mutant human SLC46A3 (SLC46A3 dC) and mCherry or mKate2-tagged organelle marker protein (red). The results were replicated in three independent experiments. Blue color, nucleus. Scale bar, 10  $\mu$ m. PTS1, peroxisomal targeting signal 1; MTS, mitochondrial targeting sequence; B4GALT (NT), N-terminal 81-amino acid human beta-1,4-galactosyltransferase.

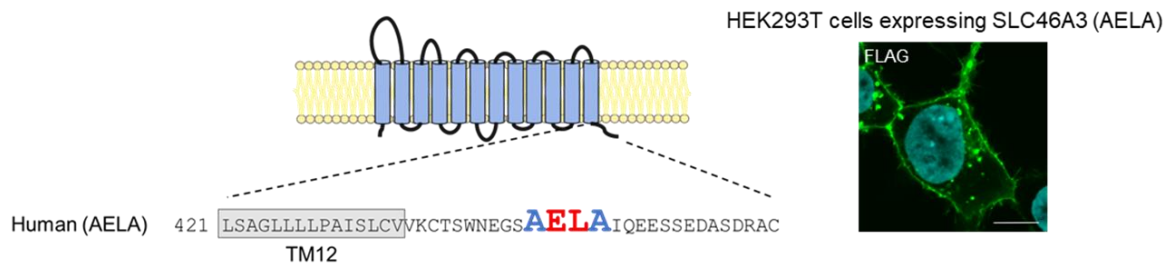


Fig. 5. (left) Predicted membrane topology and C-terminal sequences of SLC46A3 (AELA). (right) Immunofluorescence staining of FLAG-tagged SLC46A3 (AELA) (green) in transfected cells by anti-FLAG antibody. HEK293T cells were transfected with 3×FLAG-tagged SLC46A3 (AELA). Blue color, nucleus. Scale bar, 10  $\mu$ m.

#### MDCKII cells expressing SLC46A3 dC

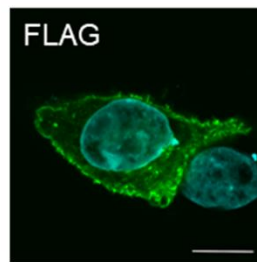


Fig. 6. Immunofluorescence staining of FLAG-tagged SLC46A3 dC (green) in MDCKII cells. MDCKII cells were transiently transfected with 3×FLAG-tagged SLC46A3 dC. Blue color, nucleus. Scale bar, 10  $\mu$ m.

## 第 2 節 SLC46A3 内因性基質の同定および輸送特性評価

SLC46A3 は SLC46A ファミリーに属し、SLC46A1 と約 30% の相同性を有する。SLC46A1 は葉酸およびメトトレキサートなどの葉酸拮抗薬を  $H^+$  依存的に輸送することが知られている<sup>55,56)</sup>。したがって、SLC46A3 が酸性条件下で有機アニオン化合物を輸送するとの仮説を立てた。この仮説を検証するために、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞を用いて、有機アニオン化合物の細胞内取り込み実験を行った。細胞外 pH 5.5 の条件下、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞および mock 細胞を [ $^3H$ ]estrone 3-sulfate ( $E_1S$ )、methotrexate、 [ $^3H$ ]nicotinate、 [ $^3H$ ]palmitate および [ $^{14}C$ ]urate を含む Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) で 5 分間作用させ、細胞内取り込み量を定量した。その結果、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において  $E_1S$  が顕著に取り込まれ、その取り込み量は mock 細胞と比較して約 10 倍高かった (Fig. 7A)。さらに、SLC46A3 dC による  $E_1S$  輸送の妥当性を検証するために、FLAG-tagged wild-type SLC46A3 および SLC46A3 dC を一過性に発現させた HEK293T 細胞を用いて、 $E_1S$  の細胞内取り込み実験を行った。その結果、SLC46A3 dC 発現細胞において  $E_1S$  の有意な取り込みが認められた (Fig. 8)。これらの結果から、SLC46A3 が  $E_1S$  を輸送するトランスポーターであることが示された。

SLC46A3 輸送活性の pH 感受性を検討するために、pH 依存的な取り込み実験を行った。MDCKII/SLC46A3 dC 細胞における  $E_1S$  取り込みは、細胞外 pH の低下に伴い上昇し、pH 4.0 から 4.5 の間で最大であった (Fig. 7B)。一方、pH 7.4 において輸送活性は消失した。これらの結果は、pH 4.5 から 5.0 に維持されているリソソームにおいて<sup>57)</sup>、SLC46A3 が効率良く機能することを示唆している。

次に、SLC46A3 dC 介在性取り込みの駆動力を検討した。イオノフォアである nigericin は細胞膜を介して  $K^+$  および  $H^+$  を交換することにより、細胞内外の  $K^+$  および  $H^+$  濃度勾配を消失させる。HBSS 中の NaCl を KCl に置換した  $K^+$  buffer を用いて、nigericin で処理した後、pH 5.0 における  $E_1S$  の取り込み実験を行った (Fig. 7C)。NaCl を KCl に置換したのみ (膜電位消失条件下) では  $E_1S$  取り込みに影響しなかった一方、nigericin を含む  $K^+$  buffer の前処理 ( $H^+$  濃度勾配消失条件下) により、取り込みが顕著に低下した。さらに、 $Na^+$  や  $Cl^-$  などの他の細胞外イオンの影響を検討したところ、いずれも  $E_1S$  の取り込みにほとんど影響しなかった (Fig. 9)。これらの結果より、SLC46A3 dC は内向き  $H^+$  濃度勾配を駆動力として  $E_1S$  を輸送することが示された。また、SLC46A3 はリソソーム内からの外向き  $H^+$  濃度勾配を利用し、基質を細胞質方向へ輸送することが示唆された。

最後に、SLC46A3 dC 介在性  $E_1S$  取り込みの速度論的パラメータを特徴づけるために、濃度依存的な取り込み実験を行い、ミカエリス・メンテン式に基づきミカエリス定数 ( $K_m$ ) を算出した。 $E_1S$  取り込みは 5 分まで直線的に増加したため、取り込み時間を 1 分に設定した (Fig. 10)。結果として、 $E_1S$  取り込みは飽和性を



示し、 $K_m$  値が  $33.3 \mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}}$  値が  $1.46 \text{ nmol/min/mg protein}$  と算出された (Fig. 7D および Table 1)。

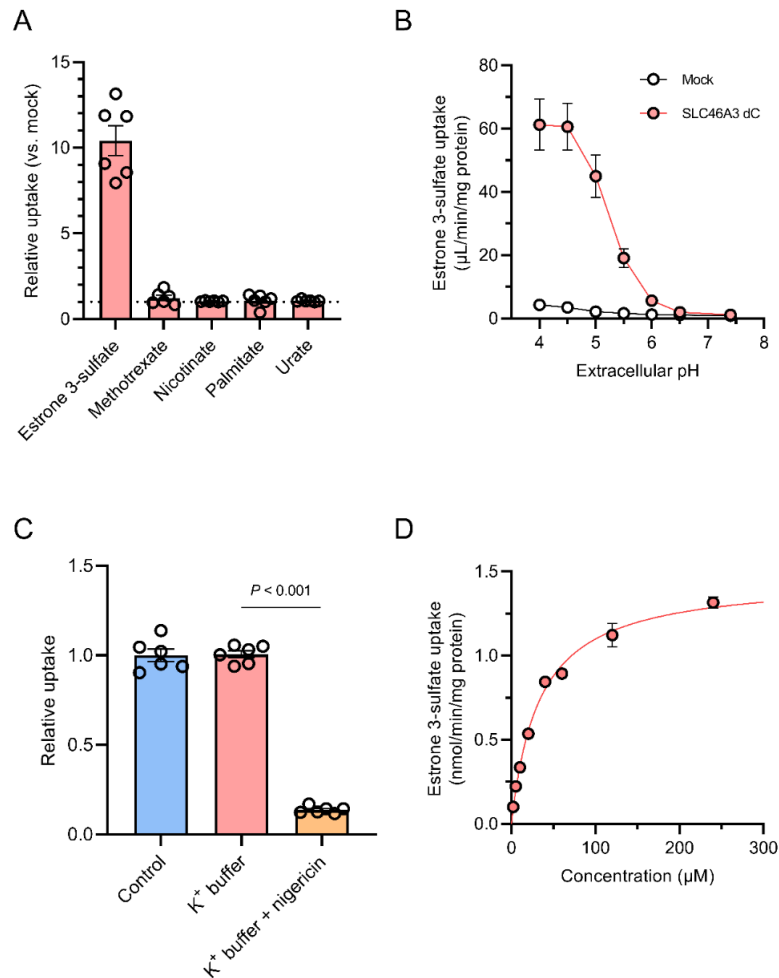


Fig. 7. SLC46A3 mediates proton-coupled estrone 3-sulfate uptake. (A) Uptake of [ $^3\text{H}$ ]estrone 3-sulfate (10 nM), methotrexate (10  $\mu\text{M}$ ), [ $^3\text{H}$ ]nicotinate (200 nM), [ $^3\text{H}$ ]palmitate (20 nM), and [ $^{14}\text{C}$ ]urate (1.8  $\mu\text{M}$ ) with 50  $\mu\text{M}$  urate in MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake for 5 min was measured in HBSS (pH 5.5). (B) pH dependence of [ $^3\text{H}$ ]estrone 3-sulfate (10 nM) uptake. Uptake for 1 min was measured in HBSS (pH 7.4) or modified-HBSS-containing citrate for pH 4.0–4.5, or MES for pH 5.0–6.5. (C) Effect of a proton gradient on [ $^3\text{H}$ ]estrone 3-sulfate uptake. The uptake was measured in HBSS (pH 5.0) or modified-HBSS in which NaCl was replaced with KCl with or without 10  $\mu\text{g/mL}$  nigericin. (D) Concentration-dependent estrone 3-sulfate uptake. Uptake for 1 min was measured in HBSS (pH 5.0). SLC46A3 dC-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in mock cells from that in MDCKII/SLC46A3 dC cells. The solid line represents the computer-fitted profile.

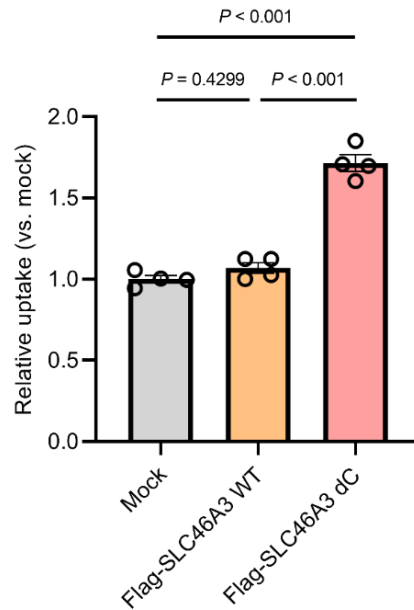


Fig. 8. Uptake of [<sup>3</sup>H]estrone 3-sulfate in HEK293T cells transiently expressing FLAG-SLC46A3 WT or FLAG-SLC46A3 dC. Uptake for 5 min was measured in HBSS (pH 5.5). Relative uptake was calculated by dividing the uptake amount in cells by that in mock cells.

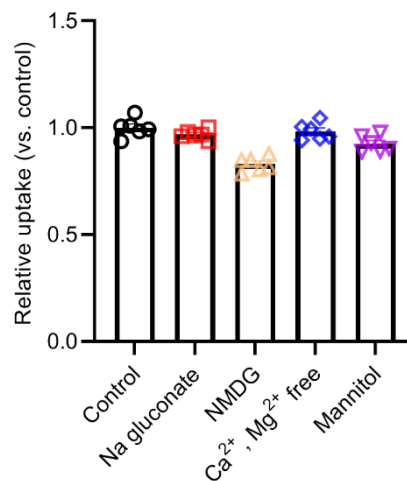


Fig. 9. Effect of extracellular ions on SLC46A3 dC-mediated [<sup>3</sup>H]estrone 3-sulfate uptake. Uptake of [<sup>3</sup>H]estrone 3-sulfate (10 nM) for 1 min was measured in HBSS (pH 5.0) or modified-HBSS in which NaCl was replaced as indicated except for “Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free” in which Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> were simply removed.

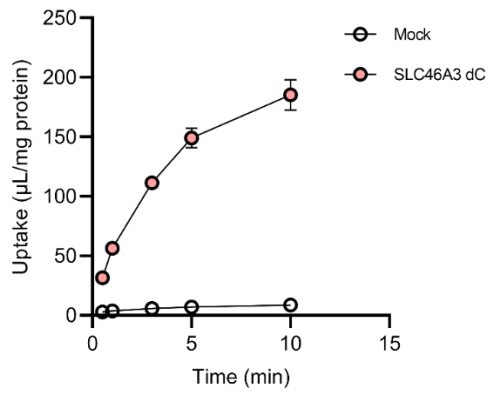


Fig. 10. Time dependence of [<sup>3</sup>H]estrone 3-sulfate uptake in MDCKII/SLC46A3 dC cells and mock cells. The [<sup>3</sup>H]estrone 3-sulfate (10 nM) uptake was measured in HBSS (pH 5.0) for the indicated time.

### 第 3 節 SLC46A3 dC 介在性 E<sub>1</sub>S 取り込みに対する様々な内因性化合物の影響

SLC46A3 の基質認識性を検討するために、E<sub>1</sub>S 取り込みに対する様々な内因性化合物の阻害効果を評価した (Fig. 11)。その結果、cholesterol sulfate を除くステロイド抱合体および胆汁酸により、E<sub>1</sub>S 取り込みが顕著に阻害された。一方、脱抱合体化ステロイドは、dehydroepiandrosterone を除き、E<sub>1</sub>S 取り込みにほとんど影響を与えなかった。また、estradiol および 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> のグルクロン酸抱合体は高い阻害活性を有するにも関わらず、*p*-acetamidophenyl β-D-glucuronide、4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide および α-naphthyl β-D-glucuronide のような比較的分子量の低いグルクロン酸抱合体は阻害活性を示さなかった (Fig. 12)。SLC46A1 の基質である葉酸やその他の水溶性ビタミン、hemin などの内因性有機アニオン化合物による阻害は観察されなかった。最近、Kim らにより、*Slc46a3* ノックアウトマウスは肝臓内への銅蓄積がみられることから、SLC46A3 が肝臓における銅ホメオスタシスに関与することが示唆された<sup>52)</sup>。SLC46A3 が銅イオンを認識するか検討するために、塩化銅による阻害実験を行った。しかし、有意な阻害効果は認められなかった。

また、40 μM の塩化銅存在下および非存在下、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞および mock 細胞の細胞内銅蓄積量を測定したが、有意な変化は認められなかった (Fig. 13)。

ステロイド抱合体および胆汁酸の SLC46A3 に対する親和性を比較するために、dehydroepiandrosterone sulfate、25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> sulfate、pregnenolone sulfate、cholate、glycocholate、および taurocholate の濃度依存的な取り込みを評価した。これらすべての化合物は MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において有意に取り込まれ (Fig. 14)、E<sub>1</sub>S の K<sub>m</sub> 値よりも低い値が算出された (Table 1)。取り込みクリアランス (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>) は 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> sulfate で最大であり、本検討で同定された基質の中で最も良好な基質であることが示唆された。pH 5.0 における予測 LogD 値は 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> sulfate、cholate、estrone 3-sulfate、pregnenolone sulfate、dehydroepiandrosterone sulfate、glycocholate、taurocholate の順で高く、E<sub>1</sub>S および cholate を除き、取り込みクリアランスは基質の脂溶性と相関した。したがって、SLC46A3 は内因性基質として脂溶性の高いステロイド抱合体および胆汁酸を優先的に認識し、生体内において、これら化合物のリソソームから細胞質への排出を担っていることが示唆された。

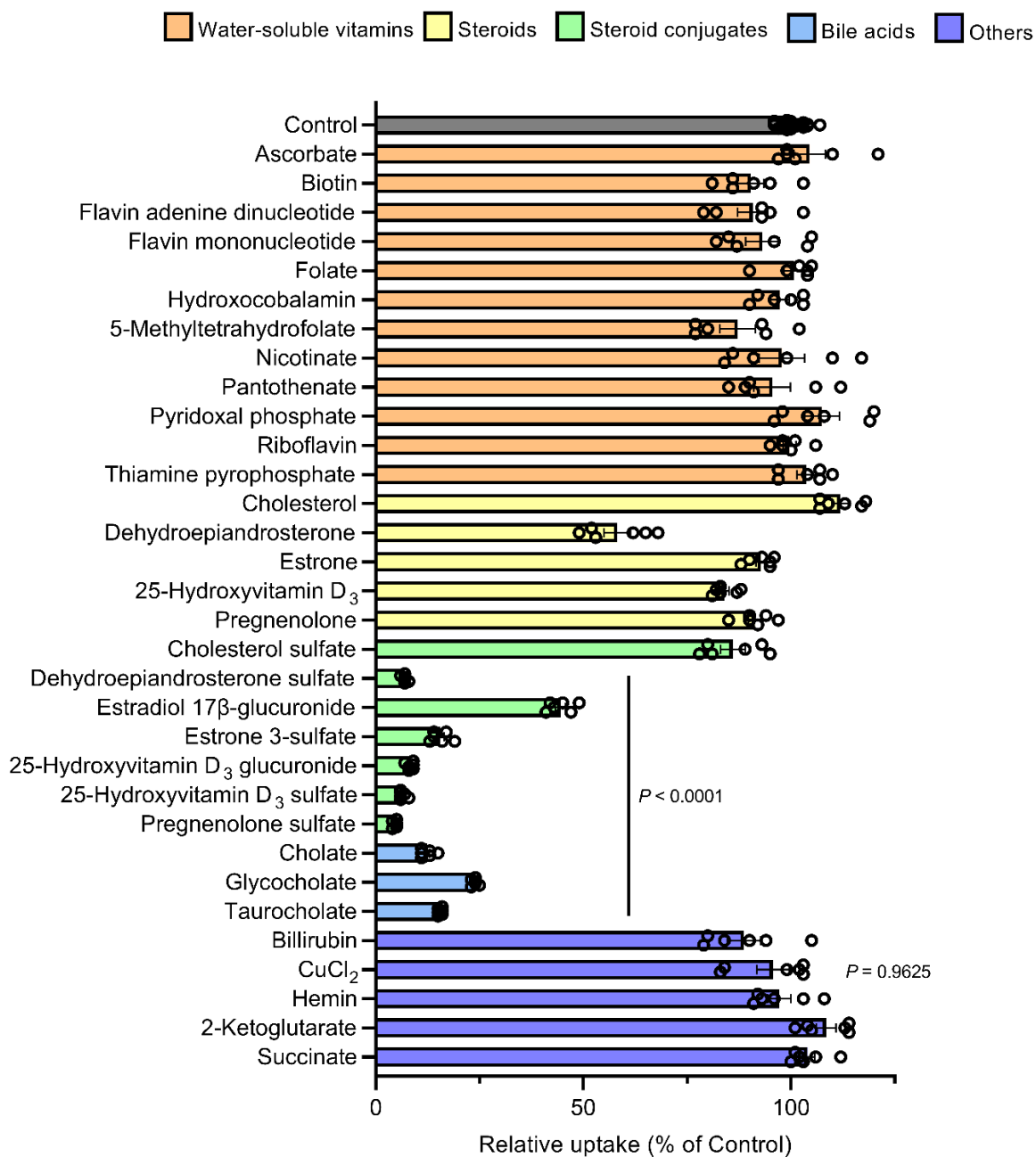


Fig. 11. Steroid conjugates and bile acids strongly suppress SLC46A3 dC-mediated estrone 3-sulfate transport. Effect of various compounds on the uptake of [<sup>3</sup>H]estrone 3-sulfate (10 nM) in MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake was performed at 37°C, pH 5.0, for 1 min in the absence or presence of inhibitors (20 μM for cholesterol, dehydroepiandrosterone, estrone, pregnenolone, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> glucuronide, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> sulfate, hemin, and bilirubin or 200 μM for the other compounds).

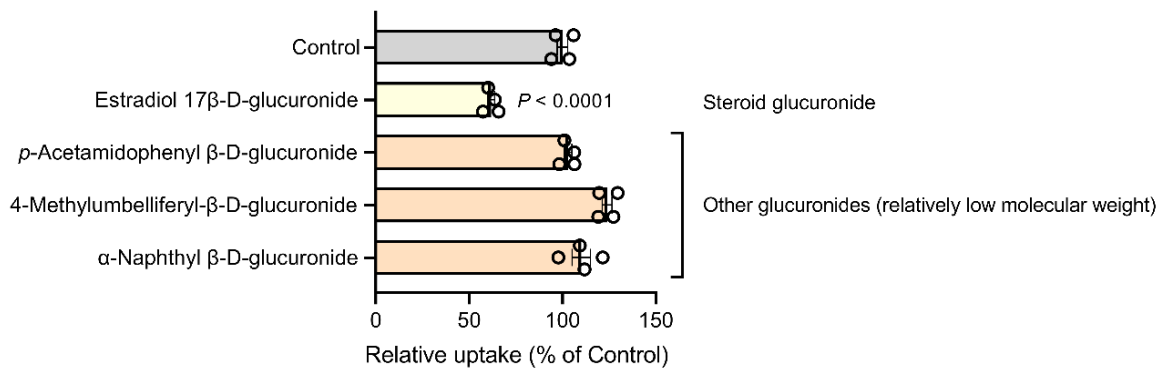


Fig. 12. Inhibitory effect of glucuronide conjugates with relatively low molecular weight on the uptake of [<sup>3</sup>H]estrone 3-sulfate (10 nM) in MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake was performed at 37°C, pH 5.0, for 1 min in the absence or presence of indicated glucuronides (200 μM).

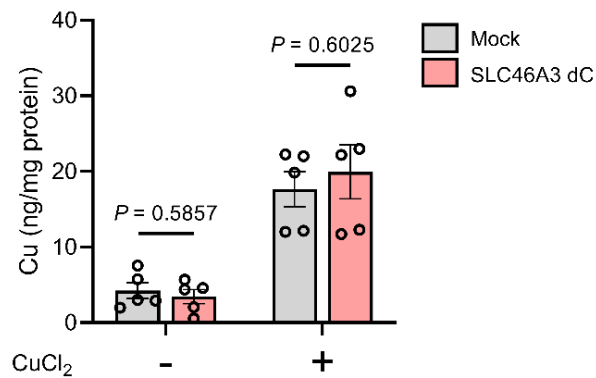


Fig. 13. Intracellular copper levels in MDCKII/SLC46A3 dC cells and mock cells. The cells were cultured in the presence or absence of extracellular copper (II) chloride (40 μM) for 1 day.

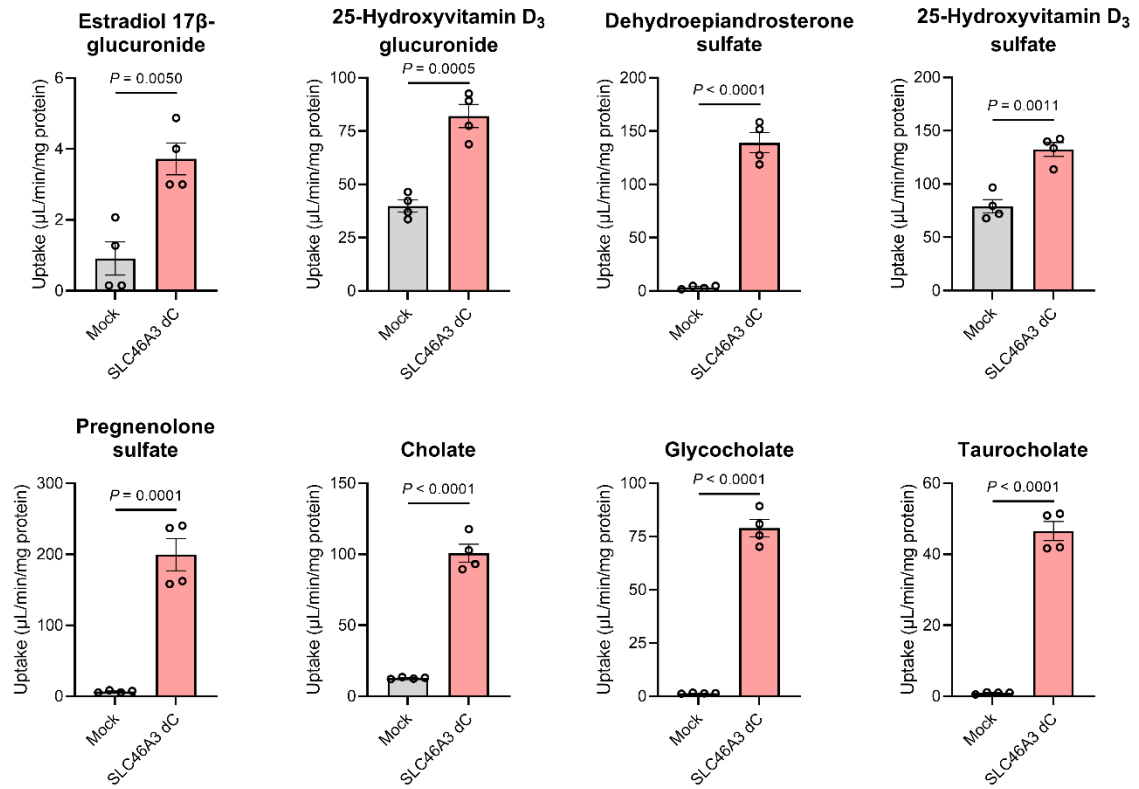


Fig. 14. Uptake of steroid conjugates and bile acids in MDCKII/SLC46A3 dC cells and mock cells. Uptake of indicated compounds (5 μM) was measured in HBSS (pH 5.0) for 1 min.

Table 1. Kinetic parameters of SLC46A3 dC-mediated steroid conjugates uptake, and predicted LogP and LogD values of steroid conjugates and bile acids.

Compounds	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (nmol/min/mg protein)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (μL/min/mg protein)	LogP	LogD <sub>5.0</sub>
Dehydroepiandrosterone sulfate	5.6 ± 1.1	1.51 ± 0.08	269.6	3.42	1.04
Estrone 3-sulfate	33.3 ± 2.7	1.46 ± 0.04	43.8	3.83	1.46
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> sulfate	0.2 ± 0.1	0.27 ± 0.02	1350.0	4.30	3.33
Pregnenolone sulfate	1.2 ± 0.4	0.79 ± 0.07	658.3	3.64	1.26
Cholate	26.7 ± 3.3	2.32 ± 0.09	86.9	2.48	1.84
Glycocholate	14.6 ± 2.7	1.31 ± 0.07	89.7	1.38	0.12
Taurocholate	11.7 ± 2.3	0.78 ± 0.04	66.7	-0.24	-1.46

The experiments were performed with two biological replicates to calculate the mean value of K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> for each compound. Data are presented as the mean ± s.e.m. (n = 4). Predicted LogP and LogD<sub>5.0</sub> values of each compound were calculated with the online platform Chemicalize developed by ChemAxon (<http://chemicalize.com>).



## 第4節 考察

これまで SLC46A3 の分子機能および生理的基質は不明であった。本章では、輸送活性に関する詳細な検討により、SLC46A3 が H<sup>+</sup>依存的なステロイド抱合体および胆汁酸トランスポーターであることを明らかにした。

SLC46A3 の H<sup>+</sup>依存的なステロイド抱合体トランスポーターとしての機能特性は哺乳類 SLC ファミリーメンバーの中で非常にユニークである。SLC10A や SLC17A、SLC22A、OATP/SLCO ファミリーメンバーなどを含むステロイド抱合体トランスポーターは数多く存在するが、これらトランスポーターは Na<sup>+</sup>勾配、膜電位、有機アニオンや HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>との交換輸送を駆動力とする<sup>58-61)</sup>。これらすべてのトランスポーターは、主に細胞膜上に局在しており、細胞膜を介したステロイド抱合体の輸送に関与している。対照的に、SLC46A3 は主にリソソームに局在しており<sup>62)</sup>、おそらくリソソーム内からの外向き H<sup>+</sup>濃度勾配を駆動力とすると考えられる。この考えは、SLC46A3 の輸送活性が H<sup>+</sup>濃度勾配を必要とすることや、リソソーム pH に相当する pH において至適であることにより支持される。ステロイド抱合体はアルブミンやビタミンD 結合タンパク質、リポタンパク質のような輸送タンパク質により、エンドサイトーシス経路を介してリソソームまで運ばれる<sup>63-65)</sup>。したがって、SLC46A3 はステロイド抱合体のリソソームからの排出に関わっていると考えられる。

SLC46A3 は C 末端領域に存在するチロシンモチーフによりリソソームへの局在制御を受けると考えられる。第1節において、SLC46A3 が主にリソソームに局在すること、および C 末端領域 (Y446-C463) の欠損が SLC46A3 の細胞膜への局在化を引き起こすことを示した。これらの結果は、SLC46A3 のリソソーム局在化が主に C 末端領域 (Y446-C463) で制御されていることを示している。さらに、446 番目のチロシンと 449 番目のロイシンをアラニンに置換した SLC46A3 (SLC46A3 [AELA]) は SLC46A3 dC と同様に細胞膜へ局在化した。したがって、哺乳類種間で保存されている Y446-L449 配列はリソソームへの局在制御に関わるチロシンモチーフであると考えられる。

SLC46A3 の内因性基質を同定したにもかかわらず、SLC46A3 の生理的役割は不明である。*Slc46a3* ノックアウトマウスを用いた最近の研究により、SLC46A3 は肝臓の銅ホメオスタシスと脂質代謝に関与することが明らかになった<sup>52)</sup>。しかし、本章では銅代謝に関与する内因性基質を同定することができなかった。また本研究において、SLC46A3 がステロイド抱合体および胆汁酸取り込みを促進する一方、塩化銅は E<sub>1</sub>S 取り込みに影響しないことを明確に示した。したがって、今のところ機序不明であるが、SLC46A3 はステロイドや胆汁酸シグナリングを制御することで、間接的に銅の細胞内動態に影響を与えていると考えられる。銅ホメオスタシスにおける SLC46A3 の役割を明らかにするために、さらなる研究が必要であ

る。

本研究で同定したステロイド抱合体や胆汁酸とエンドサイトーシスとの関連性を見出すことができなかった。SLC46A3 はステロイド抱合体や胆汁酸を介した細胞内シグナリングによりエンドサイトーシスを制御すると考えられるが、エンドサイトーシス制御機構に関するさらなる研究が必要である。

## 第 5 節 小括

本章では、SLC46A3 機能評価のための細胞株の樹立、分子機能および生理的基質の同定、輸送特性評価に関する検討を行った。

SLC46A3 の一次構造を解析した結果、C 末端領域にチロシンモチーフ様配列を有することが明らかになった。この配列を含む C 末端領域の欠損により、SLC46A3 の局在はリソソームから細胞膜へ変化した。

SLC46A3 dC を安定発現させた MDCKII 細胞を用いて各種有機アニオン化合物の細胞内取り込みを検討した結果、SLC46A3 dC 発現細胞において E<sub>1</sub>S 取り込みが顕著に増大した。SLC46A3 dC 介在性 E<sub>1</sub>S 取り込みは、細胞外 pH 依存的であり、pH 4.0 から 4.5 の間で最大活性を示す一方、pH 7.4 において消失した。さらに、この取り込みはイオノフォアである nigericin 処理により低下した。

様々な内因性化合物による阻害実験の結果、E<sub>1</sub>S 取り込みはステロイド抱合体および胆汁酸により有意に阻害されることが明らかとなった。阻害活性を示したこれら化合物はいずれも SLC46A3 dC 発現細胞において顕著な取り込みが観察された。

以上より、SLC46A3 は H<sup>+</sup>依存的なステロイド抱合体および胆汁酸トランスポーターであることが示された。

## 第 2 章 T-DM1 薬効発現における SLC46A3 の役割の解明

T-DM1 は HER2 モノクローナル抗体である trastuzumab、非切断型リンカーである SMCC リンカーおよびチューブリン阻害剤である DM1 より構成される<sup>11,12)</sup>。投与された T-DM1 はがん細胞表面の HER2 に結合した後、エンドサイトーシスにより内在化され、リソソームへ移行する。リソソームにおいて、T-DM1 は分解され、活性代謝物である Lys-SMCC-DM1 を遊離する (Fig. 15)。Lys-SMCC-DM1 は分子量が 1103.71 であり、両性イオンであることから、生体膜透過性が非常に低い<sup>16)</sup>。したがって、何かしらの特殊な膜透過機構が関与すると考えられる。

第 1 章において、SLC46A3 が H<sup>+</sup>依存的なステロイド抱合体および胆汁酸トランスポーターであることが示され、リソソームから細胞質へこれら基質を輸送することが示唆された。研究当初、SLC46A3 はエンドサイトーシス経路を制御することで T-DM1 の薬効を制御すると予想したが、これら内因性基質とエンドサイトーシスとの関連性は不明であり、T-DM1 薬効発現メカニズムにおける SLC46A3 の役割は明らかになっていない。

本章では、SLC46A3 が Lys-SMCC-DM1 をリソソームから細胞質へ直接輸送することで T-DM1 の薬効を制御すると仮説を立て、SLC46A3 の Lys-SMCC-DM1 輸送に関する検討を行った。

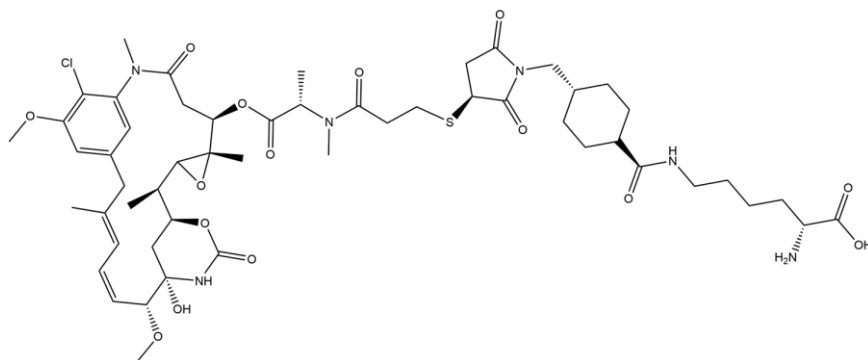


Fig. 15. Chemical structure of Lys-SMCC-DM1.

## 第 1 節 SLC46A3 の Lys-SMCC-DM1 トランスポーターとしての機能同定

がん細胞における SLC46A3 の発現量の低下は T-DM1 抵抗性を引き起こす<sup>44,46,47,66</sup>)。SLC46A3 が T-DM1 のリソソームにおける分解物である Lys-SMCC-DM1 を直接輸送するか検討するために、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞および mock 細胞における Lys-SMCC-DM1 取り込み実験を行った。その結果、Lys-SMCC-DM1 の取り込みは、mock 細胞に比較して、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において顕著に大きいことが示された (Fig. 16A)。また、T-DM1 の payload である DM1 も同様に MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において有意に高い取り込みが認めれた。これらの取り込みは、細胞外 pH 感受性であり、第 1 章で示された E<sub>1</sub>S 取り込みの pH 依存性と一致する結果であった (Fig. 16B および Fig. 7B)。さらに、E<sub>1</sub>S 取り込みは、Lys-SMCC-DM1 および DM1 により有意に阻害された (Fig. 16C)。逆に、Lys-SMCC-DM1 および DM1 の取り込みは E<sub>1</sub>S により顕著に阻害された (Fig. 16D)。これらの結果から、Lys-SMCC-DM1 および DM1 は SLC46A3 により直接認識され輸送されることが示された。さらに、SLC46A3 は DM1 の化学構造部分を認識することが示唆された。

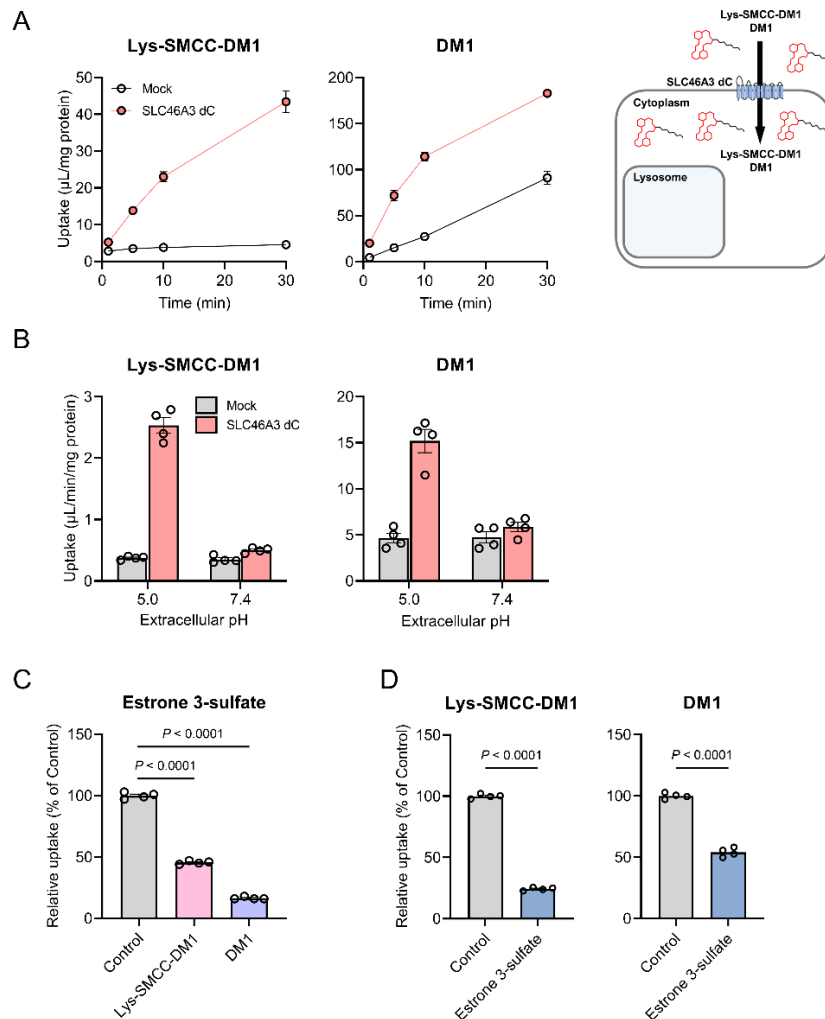


Fig. 16. SLC46A3 recognizes Lys-SMCC-DM1 and DM1 as substrates. (A) Time-dependent uptake of Lys-SMCC-DM1 (5  $\mu$ M) and DM1 (1  $\mu$ M) in the MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake was performed at pH 5.0. (B) pH-dependent uptake of Lys-SMCC-DM1 (5  $\mu$ M) and DM1 (1  $\mu$ M) in the MDCKII/SLC46A3 dC cells. (C) Inhibitory effect of Lys-SMCC-DM1 and DM1 on the uptake of [ $^3$ H]estrone 3-sulfate (10 nM) in MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake was performed at pH 5.0 in the absence or presence of Lys-SMCC-DM1 and DM1 (200  $\mu$ M). (D) Inhibitory effect of estrone 3-sulfate on the uptake of Lys-SMCC-DM1 (10  $\mu$ M) and DM1 (1  $\mu$ M). Uptake was performed at pH 5.0 in the absence or presence of estrone 3-sulfate (200  $\mu$ M).

## 第 2 節 SLC46A3 阻害剤の探索

リソソームに局在する内因性の SLC46A3 が Lys-SMCC-DM1 トランスポーターとして機能するかを直接観測することは困難であるが、これまでの結果より、SLC46A3 の輸送機能を阻害する化合物は、リソソームでの SLC46A3 を介した Lys-SMCC-DM1 の輸送を阻害し、T-DM1 の有効性を低下させる可能性がある (Fig. 17)。この可能性を検証するために、まず SLC46A3 の阻害剤を探索した<sup>67-69)</sup>。本検討では、リソソーム内腔が Lys-SMCC-DM1 および阻害剤の相互作用点であることを考慮し、リソソーム蓄積性薬物 (lysosomotropic drugs) を選択した。SLC46A3 dC 介在性 Lys-SMCC-DM1 取り込みに対する阻害効果を検討したところ、clarithromycin、erythromycin および rifabutin により、その取り込みが顕著に阻害された (Fig. 18A)。一方、chloroquine、clindamycin および imipramine による阻害効果は認められなかった。これら lysosomotropic drugs は、SLC46A3 dC 介在性 E<sub>1</sub>S 取り込みに対しても同様の阻害活性を示した (Fig. 18B)。

また、これら lysosomotropic drugs が SLC46A3 により輸送されるか検討した。pH 5.0 における clarithromycin および rifabutin の細胞内取り込みは MDCKII/SLC46A3 dC 細胞と mock 細胞で同程度であった (Fig. 19)。一方、erythromycin 取り込みは MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において有意に高かったが、その取り込み活性は胆汁酸やステロイド抱合体の輸送活性と比較して低かった (Fig. 15)。これらの結果は、SLC46A3 の輸送機能を阻害する lysosomotropic drugs は SLC46A3 の基質というよりもむしろ阻害剤であることを示している。さらに、Chemicalize (<https://chemicalize.com>) により pH 5.0 における荷電状態を予測した結果、clarithromycin、erythromycin および rifabutin は正電荷を、E<sub>1</sub>S は負電荷を有すると予測された。また、Lys-SMCC-DM1 および DM1 は電荷を有しないと予測された (Table 2)。以上より、SLC46A3 は正電荷を有する化合物を良好な基質として認識しないことが示唆された。

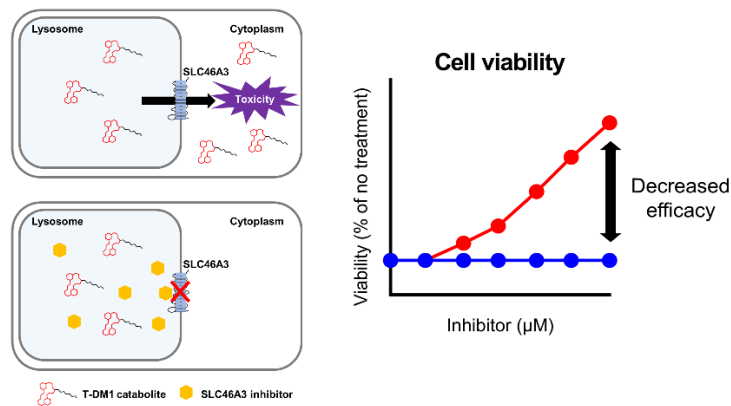


Fig. 17. Predicted schematic and results of Lys-SMCC-DM1-drug interaction through SLC46A3 in lysosomes. Impairment of lysosomal SLC46A3 function by a potent SLC46A3 inhibitor cause the inhibition of Lys-SMCC-DM1 escape from lysosomes, thereby reducing T-DM1 cytotoxicity. The predicted profiles of cell viability treated with T-DM1 in the presence (a red line) or absence (a blue line) of a SLC46A3 inhibitor are shown.

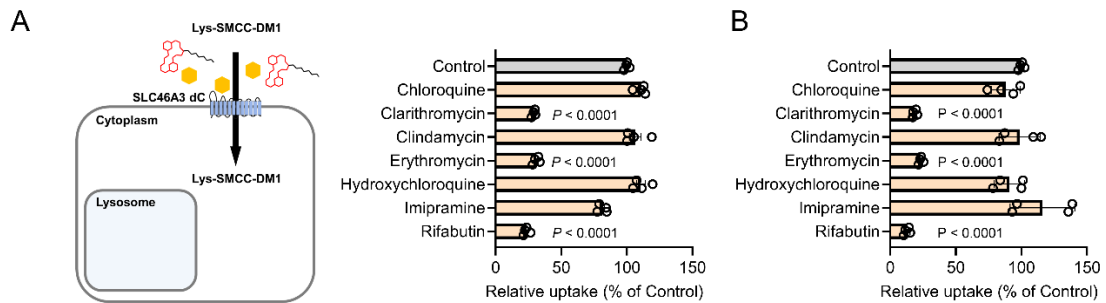


Fig. 18. Inhibitory effect of lysosomotropic drugs on the uptake of (A) Lys-SMCC-DM1 (5  $\mu$ M) or (B) [ $^3$ H]estrone 3-sulfate (10 nM) in MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake was performed at pH 5.0 in the absence or presence of lysosomotropic drugs (200  $\mu$ M).



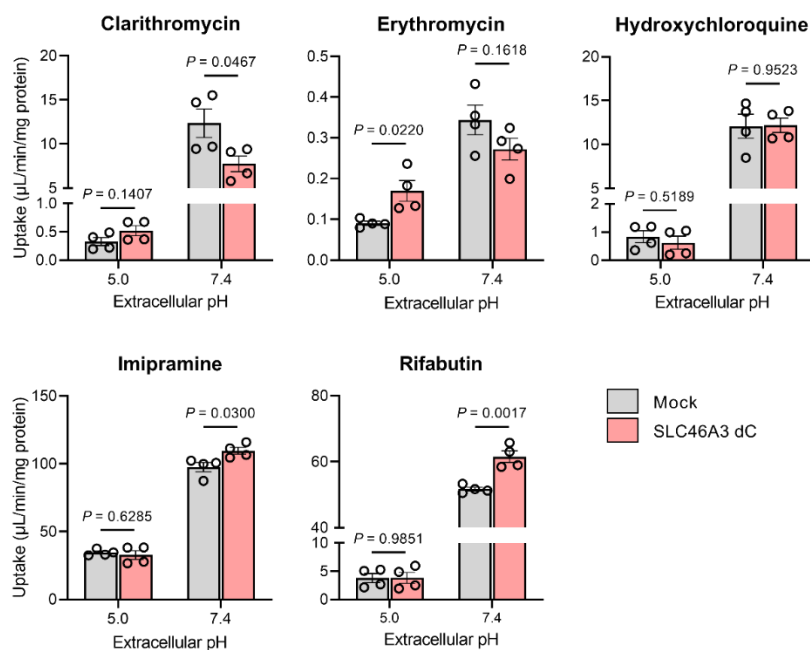


Fig. 19. Uptake of lysosomotropic drugs in MDCKII/SLC46A3 dC cells and mock cells. Uptake of indicated compounds (2 μM) for 5 min was measured in HBSS (pH 5.0 and 7.4).

Table 2. Predicted pK<sub>a</sub> value and charge status of lysosomotropic drugs, DM1 compounds, and estrone 3-sulfate

Compounds	pK <sub>a</sub> (strongest basic)	Charge at pH 5.0
Chloroquine	10.32	+ 2
Clarithromycin	9.00	+ 1
Clindamycin	7.55	+ 1
Erythromycin	9.00	+ 1
Hydroxychloroquine	9.76	+ 2
Imipramine	9.20	+ 1
Rifabutin	9.03	+ 1
DM1	- 1.93	0
Lys-SMCC-DM1	9.52	0 (zwitterion)
Estrone 3-sulfate	N.A.	- 1

The pK<sub>a</sub> values and charge statuses were calculated with the online platform Chemicalize developed by ChemAxon (<http://chemicalize.com>). N.A., not applicable.

### 第3節 T-DM1 の殺細胞効果に対する SLC46A3 阻害剤の影響

SLC46A3 阻害剤が T-DM1 の薬効に影響するか検討するために、HER2 陽性乳がん細胞株である SK-BR-3 細胞を用い、T-DM1 および SLC46A3 阻害剤存在下における細胞生存率を評価した。本検討で使用する T-DM1 の濃度は、SK-BR-3 細胞に対する T-DM1 の IC<sub>50</sub> 値に基づき設定した (Fig. 20)。期待通り、SLC46A3 阻害剤である clarithromycin、erythromycin および rifabutin は、顕著に細胞生存率を上昇させ、0.01 µg/mL の T-DM1 存在下では約 50%から 100%まで、0.03 µg/mL の T-DM1 存在下では約 10%から 50%まで上昇した (Fig. 21)。この結果から、SLC46A3 阻害効果を有する lysosomotropic drugs により、T-DM1 の殺細胞効果が減弱することが示された。対照的に、SLC46A3 阻害効果をほとんど示さなかった chloroquine、hydroxychloroquine および imipramine はわずかに細胞生存率を上昇させ、clindamycin は T-DM1 の殺細胞効果に影響を与えなかった。HER2 陽性乳がん細胞株である HCC1954 細胞および KPL-4 細胞を用いた検討においても、chloroquine、hydroxychloroquine および imipramine により細胞生存率が上昇したことを除き、同様の結果が得られた (Fig. 22)。Chloroquine、hydroxychloroquine および imipramine の T-DM1 殺細胞効果に対する影響は細胞間で異なった。これは、リソソームストレスに対する適応メカニズムが細胞によって異なることに起因すると考えられる<sup>70,71)</sup>。

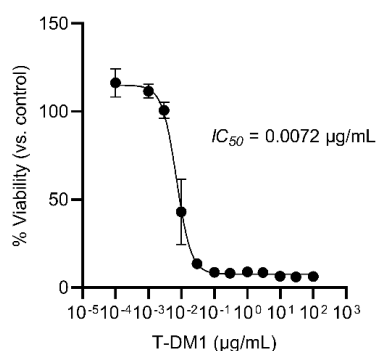


Fig. 20. Calculation of the IC<sub>50</sub> value of T-DM1 in SK-BR-3 cells. Cells were exposed to indicated concentration of T-DM1 for 4 days. Solid line is computer-fitted profile.

Pregnenolone sulfate は、高親和性の SLC46A3 基質であり、リソソーム蓄積性を示さない。T-DM1 の薬効に対する pregnenolone sulfate の影響を検討した結果、clarithromycin や rifabutin よりも高濃度において細胞生存率を上昇させた (Fig. 14J)。Pregnenolone sulfate は低膜透過性であり、細胞膜を透過するためにはトランスポーターが必要であるため (Fig. 13)、細胞内濃度は細胞外濃度よりも低いと考えられる。また、そのリソソーム内濃度はさらに低いと推察される。したがっ

て、lysosomotropic drugs とは対照的に、リソソーム SLC46A3 の機能を阻害する  
 ためには、比較的高濃度の細胞外 pregnenolone sulfate が必要であると考えられる。

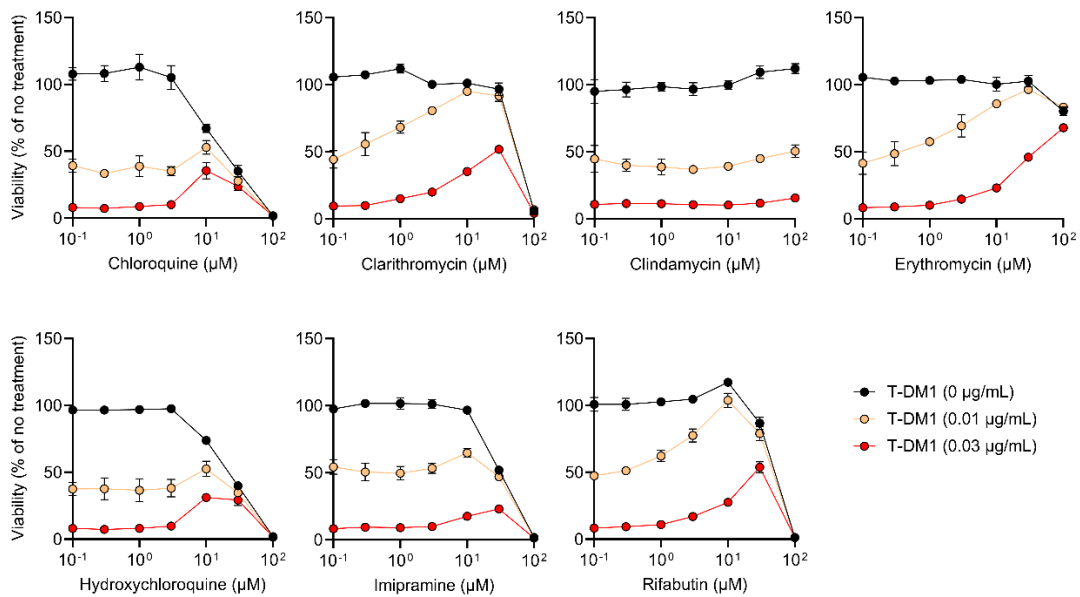


Fig. 21. Effect of lysosomotropic drugs on T-DM1 cytotoxicity. SK-BR-3 cells were exposed to T-DM1 (0  $\mu\text{g/mL}$ ; black, 0.01  $\mu\text{g/mL}$ ; yellow, 0.03  $\mu\text{g/mL}$ ; red) for 4 days in the presence of lysosomotropic drugs as indicated.

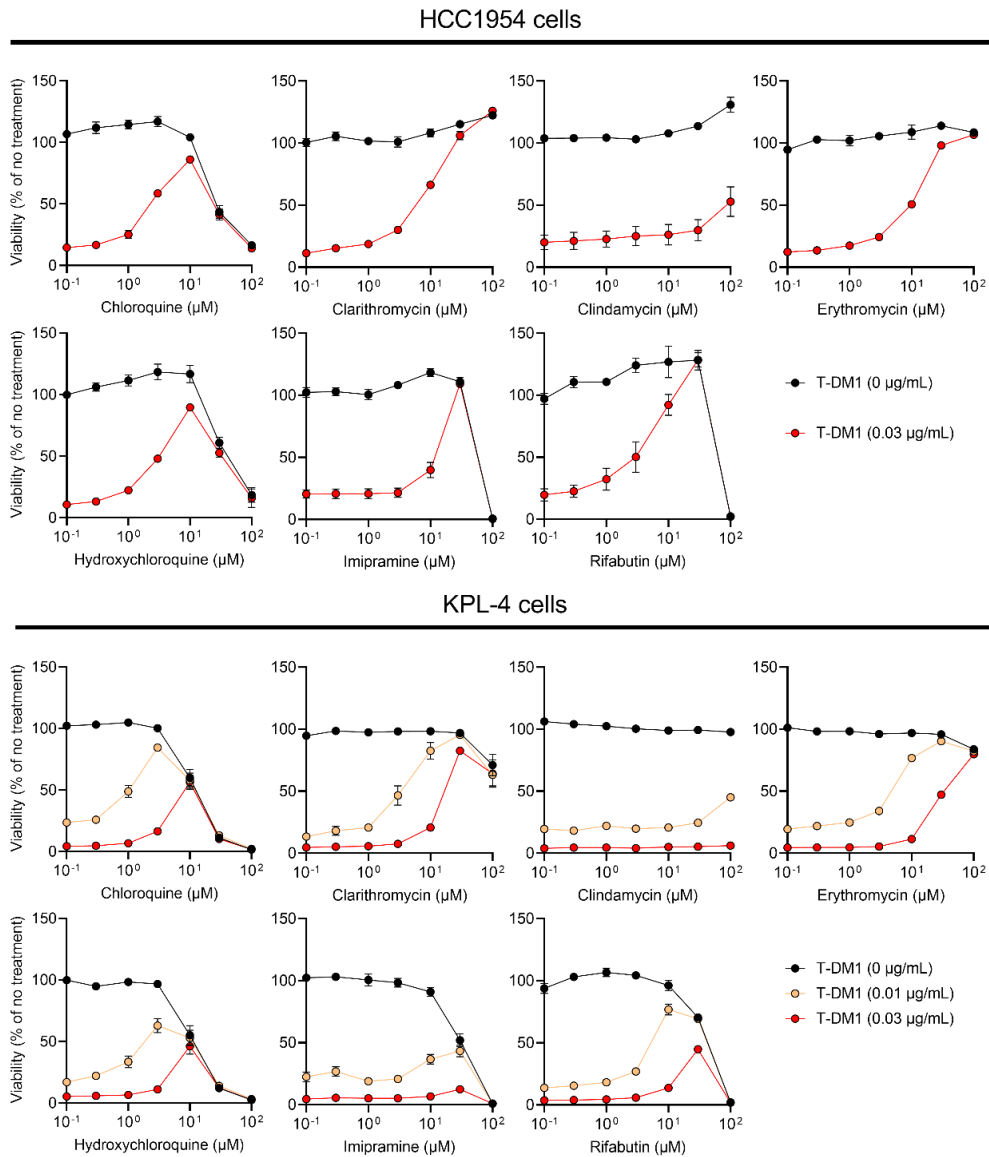


Fig. 22. Effect of lysosomotropic drugs on T-DM1 cytotoxicity in HCC1954 and KPL-4 cells. the cells were exposed to T-DM1 (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; black, 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; yellow, 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; red) for 4 days in the presence of lysosomotropic drugs as indicated.

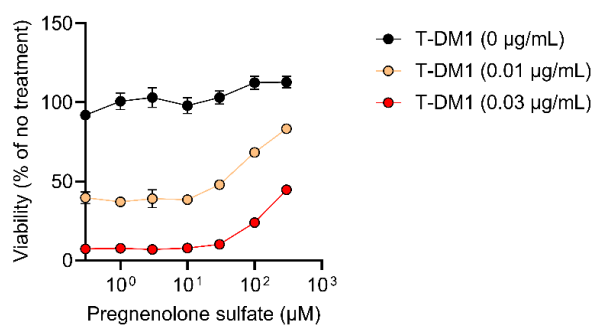


Fig. 23. Effect of pregnenolone sulfate on T-DM1 cytotoxicity. SK-BR-3 cells were exposed to T-DM1 (0 µg/mL; black, 0.01 µg/mL; yellow, 0.03 µg/mL; red) for 4 days with pregnenolone sulfate as indicated concentration.

#### 第 4 節 T-DM1 分解過程に対する lysosomotropic drugs の影響

Lysosomotropic drugs がリソソームにおける T-DM1 の分解を抑制する可能性を排除するために、Alexa Fluor 488 修飾した抗ヒト IgG 抗体を用いて免疫染色を行い、T-DM1 作用後の細胞内に残存する IgG を検出した<sup>41)</sup>。HCC1954 細胞は T-DM1 を 15 分間暴露させた後、chloroquine、clarithromycin、imipramine および rifabutin 存在下あるいは非存在下で 1 日培養した。その結果、chloroquine および imipramine 作用群で顕著な蛍光が観察され (Fig. 24)、これら化合物が T-DM1 の分解抑制を介して T-DM1 の薬効を低下させることが示唆された。この結果は、以前の報告と一致した<sup>41)</sup>。一方、clarithromycin および rifabutin は、作用群における残存 T-DM1 染色の程度が対照群と比較し同様であったことから、リソソームにおける T-DM1 の分解に影響しないことが示された。

以上より、SLC46A3 阻害剤はリソソームから細胞質への Lys-SMCC-DM1 輸送を阻害することで、T-DM1 の薬効を減弱させることが示唆された。

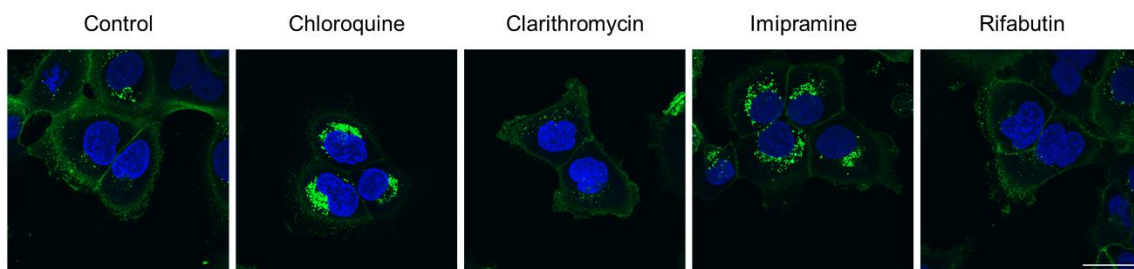


Fig. 24. Immunofluorescence staining of T-DM1(green). HCC1954 cells were pulsed with 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  T-DM1 for 15 min at 37°C, and chased for 1 day in the presence or absence of chloroquine (10  $\mu\text{M}$ ), clarithromycin (30  $\mu\text{M}$ ), imipramine (30  $\mu\text{M}$ ), and rifabutin (30  $\mu\text{M}$ ). Blue color, nucleus. Scale bar, 30  $\mu\text{m}$ .

## 第 5 節 考察

これまで SLC46A3 はいくつかの非切断型リンカーADC の薬効発現に重要であることが報告されてきたが、ADC 治療における役割は不明であった。本章では、SLC46A3 が Lys-SMCC-DM1 を直接輸送すること、および SLC46A3 阻害剤により T-DM1 の薬効が減弱することを明らかにした。本知見は、T-DM1 薬効発現メカニズムにおける SLC46A3 の重要な役割を分子レベルで解明するとともに、非切断型リンカーADC の開発に貢献し得るものである。

第 1 節において、SLC46A3 が T-DM1 のリソソームにおける分解物である Lys-SMCC-DM1 を輸送することが示された。また、第 2 節では、いくつかの lysosomotropic drugs により、その輸送活性が阻害されることが示された。Hamblett らは SLC46A3 のノックダウンが T-DM1 耐性を引き起こすこと、およびリソソーム内に Lys-SMCC-DM1 が蓄積することを実証し、SLC46A3 のリソソーム Lys-SMCC-DM1 exporter としての役割を提唱した<sup>47)</sup>。これらをまとめると、次のような T-DM1 薬効発現メカニズムが考えられる。HER2 に結合した T-DM1 は、内在化された後リソソームに移行し、Lys-SMCC-DM1 を遊離する。そして、遊離した Lys-SMCC-DM1 は SLC46A3 によりリソソームから細胞質へ輸送され、チューブリンを阻害することで殺細胞効果を発揮する。一方、clarithromycin、erythromycin および rifabutin のような SLC46A3 阻害剤が T-DM1 殺細胞効果を顕著に低下させるという結果は、がん細胞における SLC46A3 の発現量の低下が T-DM1 の耐性に関連することと一致する<sup>44,46)</sup>。Lysosomotropic drugs はイオントラッピングメカニズムにより、エンドソームやリソソームのような酸性コンパートメントに著しく蓄積する<sup>67,68)</sup>。したがって、lysosomotropic な SLC46A3 阻害剤は、SLC46A3 によるリソソーム膜を介した Lys-SMCC-DM1 の排出を阻害することにより、T-DM1 の有効性を低下させると考えるのが妥当である。

注目すべきことに、SLC46A3 はリソソームから細胞質への輸送方向性と幅広い基質認識性を有し、Lys-SMCC-DM1 のような比較的分子量の大きい分子を輸送する。本章では、SLC46A3 が様々なステロイド抱合体だけでなく、構造の異なる Lys-SMCC-DM1 (分子量 1103.7) や DM1 を輸送することが示された。したがって、SLC46A3 の基質特異性は他のリソソームトランスポーターよりも低いと考えられる<sup>25-34)</sup>。ABCB1/MDR1/P-gp は細胞膜だけでなくリソソーム膜にも存在する多剤トランスポーターであるが、薬物を細胞質からリソソームへ輸送するため、薬物排出経路として薬物のリソソームへの隔離に重要であることが示されている<sup>35)</sup>。対照的に、SLC46A3 はエンドサイトーシスを介する薬物のリソソームから細胞質への脱出に重要な役割を果たすと考えられる。SLC46A3 が薬物送達に有用であるか検討するために、SLC46A3 の基質認識性に関するさらなる研究が必要である。



## 第 6 節 小括

本章では、SLC46A3 の Lys-SMCC-DM1 輸送に関する検討を行った。

Lys-SMCC-DM1 の細胞内取り込みは mock 細胞と比較し MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において有意に高く、時間依存的に増加した。この取り込みは細胞外 pH 感受性であり、pH 5.0 で高かった一方、pH 7.4 においては mock 細胞と同程度であり、E<sub>1</sub>S 取り込みの pH 依存性と一致した。さらに、SLC46A3 dC 介在性 Lys-SMCC-DM1 取り込みは、SLC46A3 の基質である E<sub>1</sub>S により阻害された。逆に、SLC46A3 dC 介在性 E<sub>1</sub>S 取り込みは Lys-SMCC-DM1 により阻害された。

SLC46A3 dC 介在性 Lys-SMCC-DM1 取り込みは lysosomotropic drugs である clarithromycin、erythromycin および rifabutin により強力的に阻害された。これら SLC46A3 阻害剤存在下において、T-DM1 作用時の細胞生存率は顕著に上昇した。また、SLC46A3 基質である pregnenolone sulfate 存在下においても、高濃度域ではあるが、同様に T-DM1 作用時の細胞生存率が上昇した。

リソソームに残存する T-DM1 を免疫染色法により評価した結果、clarithromycin および rifabutin 作用群における残存 T-DM1 は対照群と同程度であった。このことより、clarithromycin および rifabutin はリソソームにおける T-DM1 の分解に影響しないことが示唆された。

以上より、SLC46A3 はリソソームから細胞質への Lys-SMCC-DM1 輸送を担うことで、T-DM1 の薬効を制御することが示唆された。

### 第3章 SLC46A3の蛍光基質の同定およびSLC46A3基質/阻害剤探索への応用

第2章において、SLC46A3がT-DM1の活性代謝物であるLys-SMCC-DM1を直接輸送することで、その薬効発現を制御することを明らかにした。さらに最近、BoehnkeらはSLC46A3が様々な細胞における脂質ナノ粒子の取り込み効率の決定因子であることを発見し、機序は不明であるが、そのエンドサイトーシスにSLC46A3が関与することが示唆されている<sup>53)</sup>。したがって、SLC46A3の基質/阻害剤の同定はADCの開発やエンドサイトーシス機構の解明を促進し、ADCや脂質ナノ粒子などのDDSの最適化につながると考えられる。

トランスポーターの*in vitro*機能評価においては、高い感度と定量性を有する評価方法が求められる<sup>72,73)</sup>。一般的に、放射性標識化合物やLC-MS/MSにより高い感度で定量できる物質がトランスポーターの機能評価に用いられる。第1章および第2章では、放射性標識体やLC-MS/MSを用いた評価により、<sup>[3H]</sup>estrone 3-sulfateやステロイド抱合体、胆汁酸などのSLC46A3の内因性基質を同定した。しかし、これらの評価方法はSLC46A3の機能を迅速かつ簡便に評価する有用性に欠けている。一方、蛍光プローブを用いた輸送評価法はこれまでに様々なトランスポーターの機能の検出や解析に応用されている<sup>74-80)</sup>。しかし、SLC46A3においては、そのような蛍光基質は同定されていない。

本章では、SLC46A3の迅速かつ簡便な機能評価方法の確立を目的として、蛍光プローブに着目し、SLC46A3の蛍光基質の探索を行った。さらに、同定した蛍光基質を用いて*in vitro*機能評価系を確立し、その妥当性を検討した。最後に、確立した機能評価系を用いて、SLC46A3の新規基質の同定を試みた。

## 第 1 節 SLC46A3 の新規蛍光基質の同定

SLC46A3 の蛍光基質を探索するために、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞を用いて、様々な蛍光化合物のスクリーニングを行った (Fig. 25A)。pH 5.0 におけるこれら蛍光化合物の取り込み実験の結果、Fig.25B に示すように、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞における 5-carboxyfluorescein (5-CF) の細胞内取り込みが mock 細胞と比較して顕著に高く、約 150 倍であった。MDCKII/SLC46A3 dC 細胞における 6-carboxyfluorescein (6-CF)、sulfonfluorescein (SF) および 5-carboxytetramethylrhodamine (5-TAMRA) の mock 細胞に対する相対的な細胞内取り込みは約 15 倍であり、6-aminofluorescein (6-AF) においては 5 倍であった。他の蛍光化合物は 2,7-dichlorofluorescein (DCF) を除き、統計的に有意であったものの、細胞内取り込み量は mock 細胞とほとんど変わらなかった。この結果は、5-CF が SLC46A3 の機能評価に最も適していることを示している。

さらに、取り込み実験後、5-CF の細胞内取り込みを蛍光顕微鏡にて確認した。MDCKII/SLC46A3 dC 細胞では強い蛍光が確認された一方、mock 細胞における蛍光はごくわずかであった (Fig. 25C)。

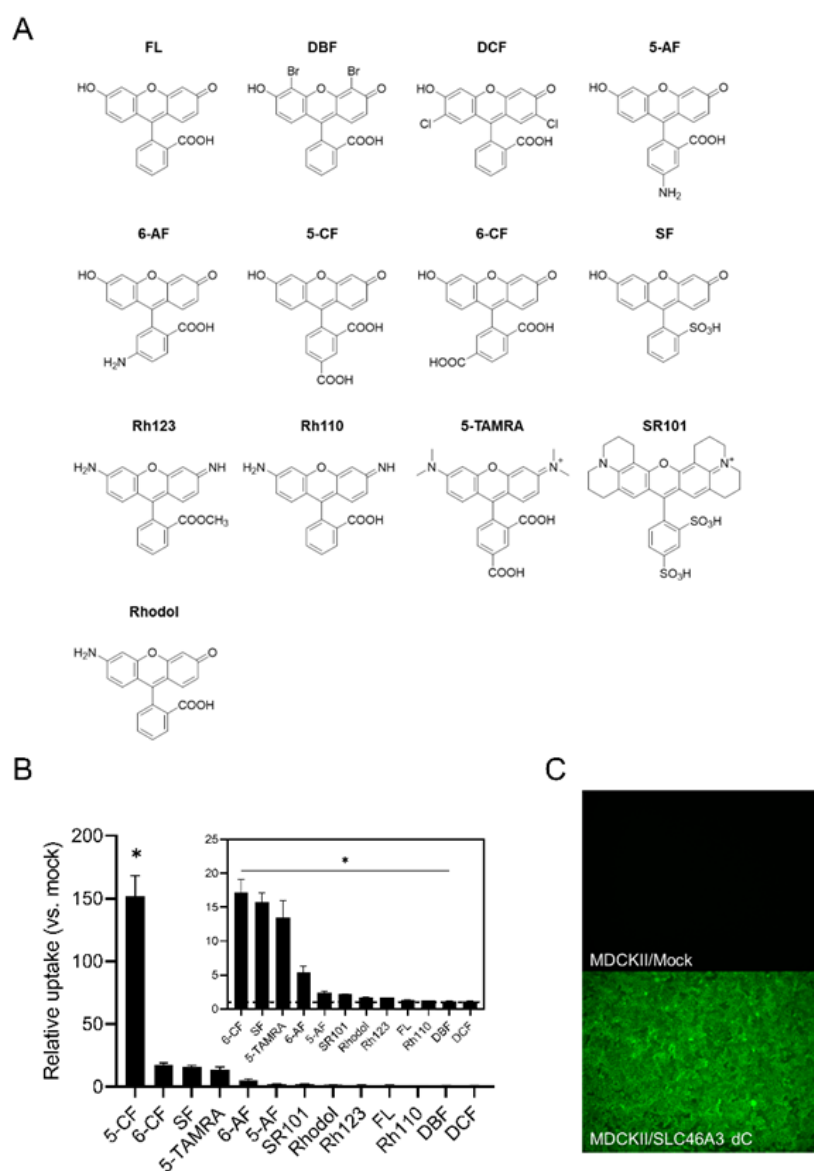


Fig. 25. Identification of fluorescent substrates of SLC46A3. (A) Chemical structure of fluorescent compounds used to screen SLC46A3 substrates. (B) Uptake of various fluorescent compounds in MDCKII cells stably expressing SLC46A3 dC. Stably transfected and mock cells were incubated with HBSS (pH 5.0) containing the indicated compounds for 10 min. The final substrate concentration was 1  $\mu$ M [fluorescein (FL), 4,5-dibromofluorescein (DBF), 2,7-dichlorofluorescein (DCF), and rhodamine 123 (Rh123)] or 5  $\mu$ M [5-aminofluorescein (5-AF), 6-aminofluorescein (6-AF), 5-carboxyfluorescein (5-CF), 6-carboxyfluorescein (6-CF), sulfonfluorescein (SF), rhodamine 110 (Rh110), 5-carboxytetramethylrhodamine (5-TAMRA), sulforhodamine 101 (SR101), and rhodol]. (C) Fluorescent microscopic images of 5-CF in MDCKII/SLC46A3 dC and mock cells.

## 第 2 節 SLC46A3 dC 介在性 5-CF 輸送特性の評価

SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みの特性を評価するために、5-CF を用いて、時間依存的、pH 依存的および濃度依存的取り込み実験を行った。まず、SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みの時間経過プロファイルを調べた。MDCKII/SLC46A3 dC 細胞における 5-CF の細胞内取り込み量は 10 分まで直線的に上昇した (Fig. 26A)。一方、mock 細胞における 5-CF 取り込みは 15 分の取り込み時間を通してわずかであった。SF の時間依存的な取り込みも同様に観察された (Fig. 27A)。

次に 5-CF 取り込みに対する細胞外 pH の影響を検討した。細胞外 pH の上昇に伴い、SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みは低下し、pH 6.5 で消失した (Fig. 26B)。SF 取り込みの pH 依存性も同様であった (Fig. 27B)。5-CF 取り込みは pH 5.0 で最大であり、pH 4.5 で顕著に低下した。この結果は、pH 4.0–4.5 で最大活性を示す E<sub>1</sub>S 取り込みとは対照的であった。5-CF は複数の pK<sub>a</sub> を有しているため、5-CF 輸送活性の低下は、5-CF の pH 依存的な化学構造の変化に起因すると考えられる。

SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みの速度論的パラメータを特徴づけるために、濃度依存的取り込み実験を行い、ミカエリス・メンテン式に基づき K<sub>m</sub> 値および V<sub>max</sub> 値を算出した。上記実験結果から、取り込み時間を 5 分、細胞外 pH を pH 5.0 に設定した。5-CF 取り込みは飽和性を示し、K<sub>m</sub> 値および V<sub>max</sub> 値は、それぞれ 5.93 μM および 526 pmol/min/mg protein と算出された (Fig. 26C)。SF 取り込みにおいても同様に飽和性が観察され、K<sub>m</sub> 値および V<sub>max</sub> 値は、それぞれ 4.66 μM および 174 pmol/min/mg protein と算出された (Fig. 27C)。

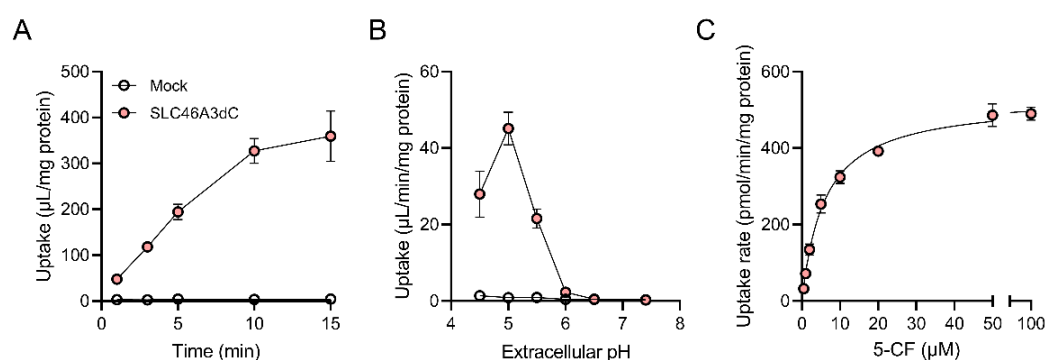


Fig. 26. Characterization of SLC46A3 dC-mediated 5-CF transport properties. (A) Time-course profiles of 5-CF uptake in MDCKII/SLC46A3 dC and mock cells. Uptake of 5-CF (5 μM) was measured in HBSS (pH 5.0) for the indicated time. (B) Effect of extracellular pH on 5-CF uptake. Uptake of 5-CF (5 μM) was evaluated for 5 min in HBSS-containing citrate at pH 4.5, MES at pH 5.0–6.5, or HEPES at pH 7.4. (C) Concentration dependence of 5-CF uptake. Uptake of 5-CF (0.5–100 μM) was measured in HBSS (pH 5.0) for 5 min. SLC46A3 dC-specific uptake was calculated by subtracting the uptake amount in mock cells from that in MDCKII/SLC46A3 dC cells. The solid line represents the computer-fitted profile.

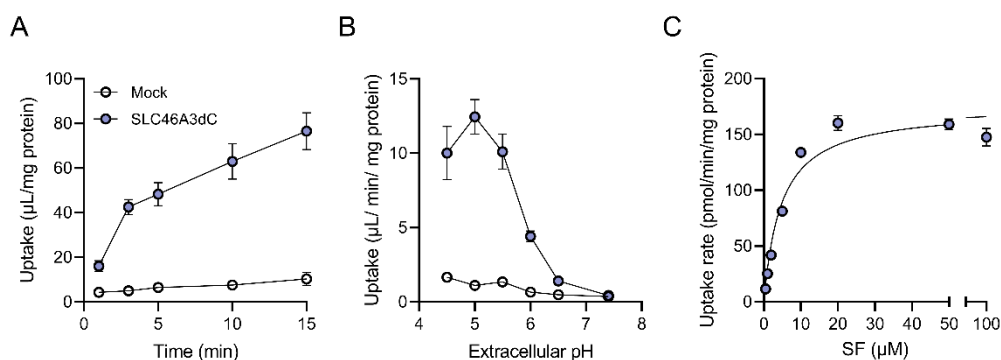


Fig. 27. Characterization of SLC46A3 dC-mediated sulfonfluorescein (SF) transport properties. (A) Time course profiles of SF uptake in MDCKII/SLC46A3 dC and mock cells. Uptake of SF (5 μM) was measured in HBSS (pH 5.0) for the indicated time. (B) Effect of extracellular pH on SF uptake. Uptake of SF (5 μM) was evaluated for 3 min in HBSS-containing citrate at pH 4.5, MES at pH 5.0–6.5, or HEPES at pH 7.4. (C) Concentration-dependence of SF uptake. Uptake of SF (0.5–100 μM) was measured in HBSS (pH 5.0) for 3 min. SLC46A3 dC-specific uptake was calculated by subtracting the uptake amount in mock cells from that in MDCKII/SLC46A3 dC cells. The solid line represents the computer-fitted profile.

### 第3節 SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みに対する既知 SLC46A3 基質/阻害剤の影響

SLC46A3 はステロイド抱合体および胆汁酸を  $H^+$  依存的に輸送する。5-CF が  $E_1S$  と SLC46A3 基質結合部位を共有するか検討するために、 $E_1S$  存在下および非存在下における 5-CF の濃度依存的な取り込み実験を評価した。Fig. 28 および Table 3 に示すように、5-CF の  $K_m$  値は  $20 \mu M$  および  $50 \mu M$  の  $E_1S$  存在下において、 $9.3 \mu M$  からそれぞれ  $13.8 \mu M$ 、 $20.6 \mu M$  まで上昇した。一方、 $V_{max}$  値に対する影響はわずかであった。この結果から、 $E_1S$  の 5-CF 取り込みに対する阻害様式は競合阻害であることが示された。

SLC46A3 はステロイド抱合体および胆汁酸だけでなく、clarithromycin、erythromycin および rifabutin のような lysosomotropic drugs や T-DM1 分解物を認識する。5-CF が  $E_1S$  の代替基質として、SLC46A3 の基質/阻害剤の探索に利用できるか検討するために、SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みに対する既知 SLC46A3 基質/阻害剤の阻害効果を評価した。MDCKII/SLC46A3 dC 細胞における 5-CF 取り込みは、chloroquine、clindamycin および hydroxychloroquine を除く被験化合物により有意に阻害された (Fig. 29A)。SF を基質として使用した場合も同様の結果が得られた (Fig. 30)。さらに、5-CF 取り込みに対する阻害効果と  $E_1S$  取り込みに対する阻害効果の間に良好な相関関係が認められた (Fig. 29B)。このことから、5-CF は  $E_1S$  の代替基質として SLC46A3 基質/阻害剤のスクリーニングに有用であることが示唆された。

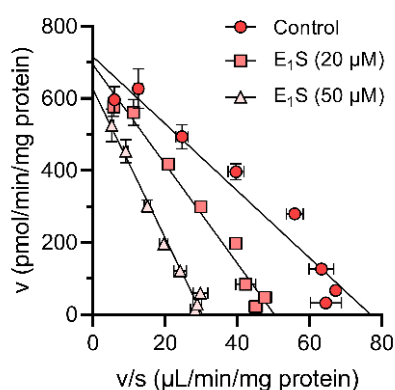


Fig. 28. Mode of inhibition of estrone 3-sulfate ( $E_1S$ ) regarding SLC46A3 dC-mediated 5-CF uptake. Concentration-dependent 5-CF uptake ( $0.5$ – $100 \mu M$ ) was evaluated for 5 min at pH 5.0 in the absence or presence of  $E_1S$ . The solid line represents the computer-fitted profile.

Table 3. Kinetic parameters of 5-CF uptake by SLC46A3 dC in the absence or presence of E<sub>1</sub>S

	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (pmol/min/mg protein)
Control	9.3 ± 0.5	715.8 ± 24.7
E <sub>1</sub> S (20 μM)	13.8 ± 0.5 **	693.8 ± 16.5
E <sub>1</sub> S (50 μM)	20.6 ± 0.9 **	625.8 ± 19.4 *

Concentration-dependent uptake of 5-CF (0.5–100 μM) was examined in the absence or presence of the indicated concentrations of E<sub>1</sub>S. K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> were obtained by simple least squares linear regression (\**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.001).

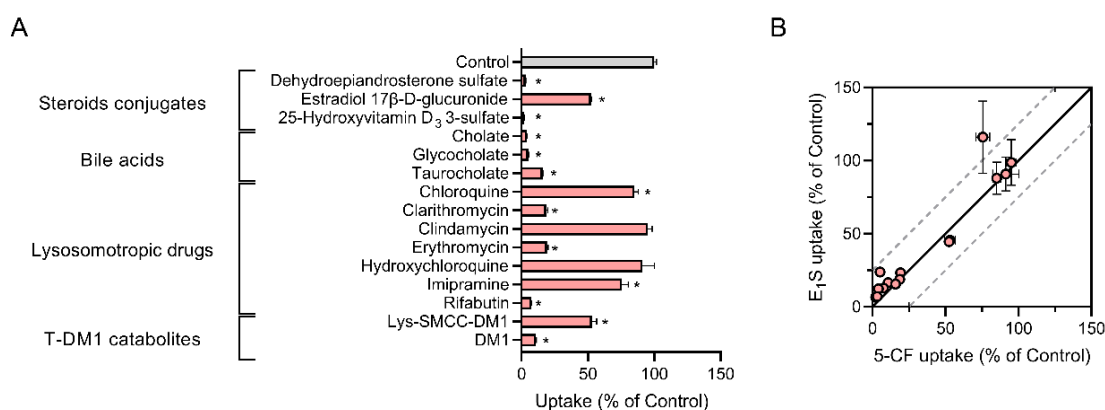


Fig. 29. (A) Inhibitory effect of steroid conjugates, bile acids, lysosomotropic drugs, and trastuzumab emtansine (T-DM1) catabolites on the uptake of 5-CF (2 μM) by SLC46A3 dC. Uptake in MDCKII/SLC46A3 dC cells was assessed at pH 5.0 for 5 min in the absence or presence of steroid conjugates, bile acids, lysosomotropic drugs, and T-DM1 catabolites at a concentration of 200 μM. (B) Comparisons between the uptake of 5-CF and E<sub>1</sub>S by SLC46A3 dC in the presence of steroid conjugates, bile acids, lysosomotropic drugs, and T-DM1 catabolites. The solid and dashed lines represent the line of 1:1 correlation and 1:1.25 or 1.25:1 correlation, respectively. The regression equation and correlation coefficient were  $Y = 1.01X + 4.99$  and 0.907, respectively.



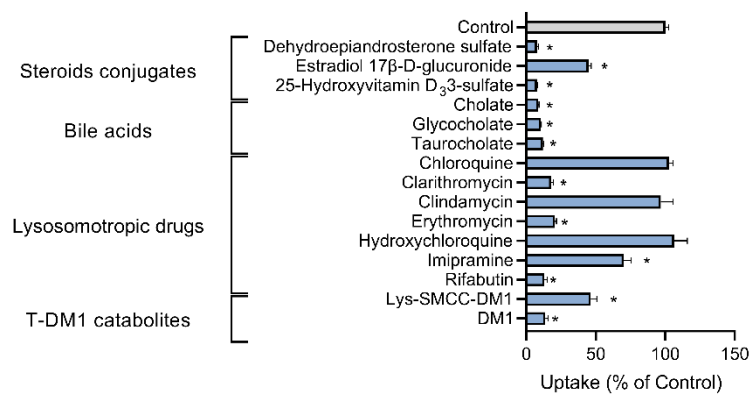


Fig. 30. Inhibitory effect of steroids conjugates, bile acids, lysosomotropic drugs, and trastuzumab emtansine (T-DM1) catabolites on the uptake of SF (2  $\mu$ M) by SLC46A3 dC. Uptake in MDCKII/SLC46A3 dC cells was performed at pH 5.0 for 3 min in the absence or presence of steroids conjugates, bile acids, lysosomotropic drugs and T-DM1 catabolites at a concentration of 200  $\mu$ M. \* $P$  < 0.05.

#### 第 4 節 5-CF を用いた輸送評価による SLC46A3 の新規基質の同定

SLC46A3 の発現は DM1 のような maytansinoids だけでなく、pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimers を搭載した非切断型リンカーADC の有効性を変化させることが報告されている<sup>46)</sup>。SLC46A3 が DM1 以外の payload を認識するか検討するために、いくつかの payload を用いて 5-CF 取り込みに対する阻害実験を行った (Fig. 31A)。SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みは、DM1 だけでなく、PBD dimer である SG3199 により強力に阻害された (Fig.31B)。Monomethyl auristatin E (MMAE) は 5-CF 取り込みを中程度阻害した一方、exatecan は 200  $\mu$ M ではほとんど阻害活性を示さなかった。DM1 および SG3199 の SLC46A3 に対する親和性を検討するために、これら化合物の濃度依存的な阻害効果を評価し、IC<sub>50</sub> 値を算出した。その結果、両化合物とも濃度依存的に SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みを阻害し、DM1 および SG3199 の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 16.4  $\mu$ M、43.6  $\mu$ M と算出された (Fig 31C)。

さらに、SLC46A3 が SG3199 を輸送するか検討するために、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞における SG3199 の直接的な取り込みを評価した。その結果、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において、mock 細胞と比較して有意に SG3199 が蓄積し、SLC46A3 dC 特異的な取り込みが時間依存的に上昇することが明らかとなった (Fig. 31D)。さらに、その取り込みは細胞外 pH 依存的であり、pH 7.4 において mock 細胞と同程度であった (Fig. 31E)。これらの結果より、SLC46A3 は SG3199 を基質として認識することが示された。

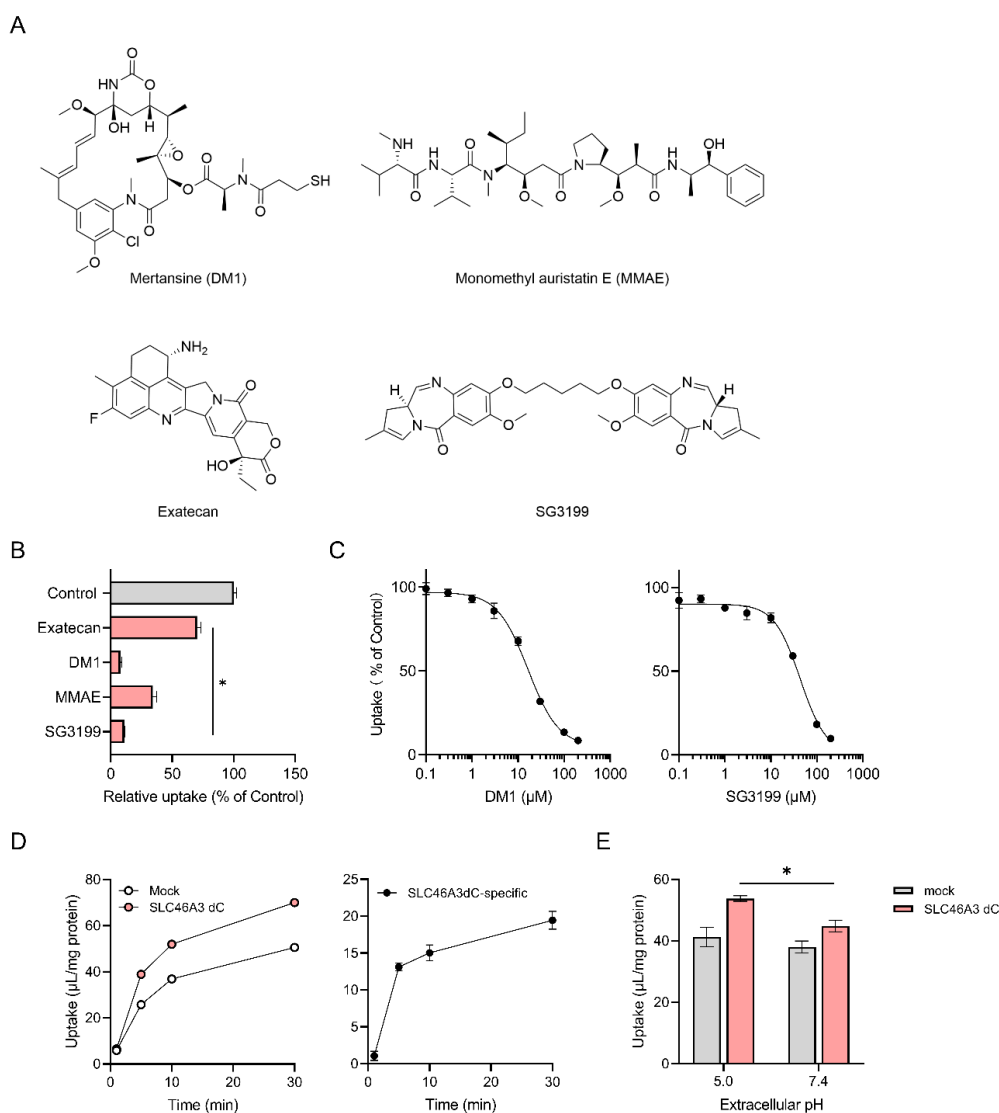


Fig. 31. Identification of a substrate of SLC46A3 by the 5-CF assay. (A) Chemical structure of the tested payloads. (B) Inhibitory effect of payloads on SLC46A3 dC-mediated 5-CF uptake. Uptake of 5-CF (2  $\mu\text{M}$ ) in MDCKII/SLC46A3 dC cells was assessed at pH 5.0 for 5 min in the presence or absence of exatecan, DM1, MMAE, and SG3199 (200  $\mu\text{M}$ ). (C) Uptake of 5-CF (1  $\mu\text{M}$ ) in MDCKII/SLC46A3 dC cells was assessed at pH 5.0 for 5 min in the presence or absence of DM1 and SG3199 (0.1–200  $\mu\text{M}$ ). The solid line represents the computer-fitted profile. (D) Time-dependent uptake of SG3199 (1  $\mu\text{M}$ ) in MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake was measured in HBSS (pH 5.0) for the indicated time. SLC46A3-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in mock cells from that in MDCKII/SLC46A3 dC cells. (E) pH-dependent uptake of SG3199 (1  $\mu\text{M}$ ) in MDCKII/SLC46A3 dC cells. Uptake was measured in HBSS (pH 5.0 and 7.4) for 10 min. \* $P < 0.01$ .

## 第 5 節 考察

T-DM1 や脂質ナノ粒子の有効性に関与する SLC46A3 はエンドサイトーシス経路を介した DDS の標的として魅力的である<sup>46,47,53)</sup>。したがって、SLC46A3 のハイスループットな機能評価系の構築は、新規基質/阻害剤を明らかにし、生理的役割の解明や医薬品開発を促進しうる。本章では、SLC46A3 の蛍光基質を同定し、5-CF が SLC46A3 の迅速かつ簡便な機能評価と基質/阻害剤のスクリーニングに有用であることを実証した。

これまでいくつかのトランスポーターの蛍光プローブが報告されてきたが<sup>74-80)</sup>、SLC46A3 の蛍光プローブは同定されていない。第 1 節では、被験蛍光化合物の中で 5-CF が SLC46A3 の最も良い基質であることを明らかにした。organic anion transporter 3/OAT/SLC22A や SLC22A24、organic anion transporting polypeptide 2B1/OATP2B1/SLCO2B1 のようないくつかの有機アニオントランスポーターは 5-CF および 6-CF を基質として認識する<sup>81-83)</sup>。これらトランスポーターは共通して SLC46A3 の基質である E<sub>1</sub>S を輸送する<sup>82,84,86)</sup>。この知見に基づくと、化学構造は異なるにもかかわらず、5-CF や 6-CF は E<sub>1</sub>S と類似した基質として挙動すると考えられる。実際、E<sub>1</sub>S の SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みに対する阻害様式は競合的であり、5-CF が E<sub>1</sub>S の代替基質として利用できることを支持している。

しかし、SLC46A3 の基質認識性は OAT や OATP と少し異なると考えられる。FL やハロゲン化 FL (DBF および DCF) は SLC22A6 や SLC22A8、SLC22A24、SLCO1B1、SLCO1B3、SLCO2B1 などの OAT や OATP の基質として知られる<sup>81,82,88,90)</sup>。一方、本研究において、これら蛍光化合物は SLC46A3 dC によりほとんど輸送されなかった。さらに、OATP2B1 は 5-CF や 6-CF を輸送するが、SF は輸送しない<sup>81)</sup>。対照的に、SLC46A3 dC はこれらすべての蛍光化合物を輸送した。SLC46A3 の輸送に必要な化学構造は定義できないが、SLC46A3 dC による取り込み活性が、6-CF と比較して 5-CF で著しいことを考慮すると、カルボン酸残基が 4'位に位置することが、SLC46A3 の輸送に重要であることが示唆される。

5-CF と SF の SLC46A3 介在性取り込み活性の比較は、SLC46A3 の基質となるための構造要求性をさらに明らかにするかもしれない。第 2 節では、SF も酸性条件下での SLC46A3 の機能評価に利用できることを示した。SLC46A3 dC の pH 依存的な輸送機能は、基質として SF を用いた場合でも、5-CF を用いた場合と同様に観察された。SF は 2'に位置するスルホン酸残基の低い pK<sub>a</sub> のために酸性条件下においても化学構造は変化しないが、5-CF はカルボン酸残基の pK<sub>a</sub> が 4.2 であるため、酸性 pH ではその化学構造がラクトン型に変化する<sup>85,87)</sup>。SLC46A3 dC による 5-CF 取り込みは、H<sup>+</sup>濃度勾配が維持されているにもかかわらず、pH 4.5 において著しく減少したことから、SLC46A3 はおそらくラクトン型の 5-CF を輸送せず、2'位のカルボン酸残基が解離している必要があることが示唆された (Fig. 32)。

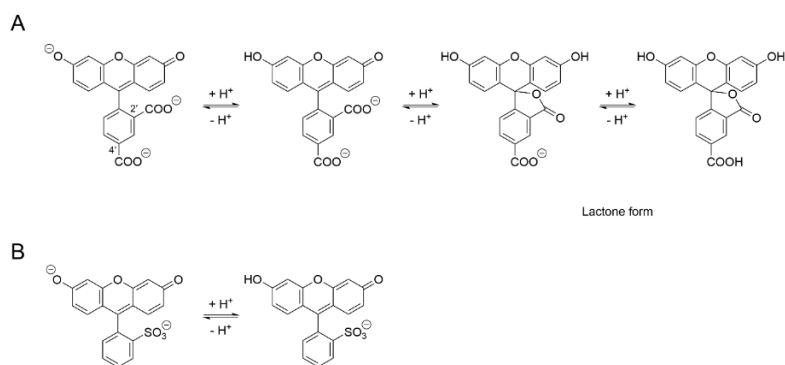


Fig. 32. pH-dependent changes in the chemical structure of (A) 5-carboxyfluorescein and (B) SF.

5-CF を用いた SLC46A3 の機能解析は簡便で SLC46A3 阻害剤スクリーニングに有用である。第 3 節では、5-CF 取り込みがステロイド抱合体、胆汁酸、DM1 化合物、マクロライドおよび rifabutin により有意に阻害されることを明らかにした。近年、SLC46A3 は T-DM1 治療や脂質ナノ粒子デリバリーのバイオマーカーとして関連することが示唆されている<sup>46,53)</sup>。したがって、これら蛍光化合物を用いた SLC46A3 阻害剤の迅速なスクリーニングは T-DM1-薬物相互作用の予測やナノ粒子の有効性を改善する化合物の同定を促進するものと考えられる。

T-DM1 分解物である DM1 および Lys-SMCC-DM1 を除き、SLC46A3 の外因性基質に関する情報はほとんどない。蛍光プローブ評価とその後の取り込み実験に基づき、5-CF や 6-CF に加えて、SLC46A3 の新規基質として SG3199 を同定することに成功した。SG3199 は高効率で DNA 鎖間架橋を生成することにより細胞毒性を発揮する合成 PBD dimer であり、ADC の payload として使われる<sup>89,91,92)</sup>。注目すべきは、SLC46A3 の発現量の低下は maytansinoid だけでなく PBD dimer 搭載した非切断型リンカーADC の有効性を低下させることが報告されている点である<sup>46)</sup>。アミノ酸とリンカーの結合した PBD dimer が SLC46A3 によって輸送されるか不明であるが、第 4 節の結果と以前の報告をまとめると、アミノ酸とリンカーの結合した PBD dimer は SLC46A3 によるリソソームから細胞質へ脱出を介して細胞毒性を引き起こすというメカニズムが示唆され、SLC46A3 が非切断型リンカーADC の開発の標的となり得ると考えられる。

本章では、リソソームに存在する SLC46A3 を介した蛍光化合物のリソソームからの脱出を評価することができなかった。この問題を解決するためには、リソソーム蓄積性を有し、低 pH においても高い蛍光量子収率を有する蛍光化合物が必要である。このような特徴を有する蛍光プローブの開発は、リソソームに局在する SLC46A3 の輸送解析や阻害剤存在下における機能変化を捉えることが可能となり、より合理的な T-DM1-薬物相互作用のスクリーニングにつながると考えられる。リソソーム SLC46A3 の迅速な評価に関するさらなる研究が必要である。

## 第 6 節 小括

本章では、SLC46A3 の蛍光基質の探索を行った。また、同定した蛍光基質を用いた *in vitro* 機能評価系の妥当性を検討した。さらに、確立した機能評価系を用いて、SLC46A3 の新規基質を同定した。

様々な蛍光化合物のスクリーニングの結果、いくつかの蛍光化合物が SLC46A3 の基質であることが明らかになり、その中で 5-CF の輸送活性が最も高かった。SLC46A3 による 5-CF の輸送活性は pH 依存性を示し、細胞外 pH 5.0 で最大であった一方、pH の上昇に伴い低下した。SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みは飽和性を示し、 $K_m$  値が  $5.93 \mu\text{M}$  と算出された。

この 5-CF 取り込みは、SLC46A3 の基質である E<sub>1</sub>S により有意に阻害され、その阻害様式は競合阻害であることが示された。さらに、5-CF 取り込みは既知 SLC46A3 基質/阻害剤により有意に阻害され、その阻害率と E<sub>1</sub>S 取り込みに対する阻害率の間に良好な相関関係が認められた。

5-CF を用いた SLC46A3 の機能評価系により ADC の payload として応用されている化合物をスクリーニングした結果、DM1 に加えて PBD dimer である SG3199 により 5-CF 取り込みが顕著に阻害された。SG3199 の細胞内取り込みを検討した結果、MDCKII/SLC46A3 dC 細胞において高く、時間依存的に増加した。さらに、この取り込みは細胞外 pH 感受性を示し、SG3199 が SLC46A3 の基質であることが示された。

以上より、SLC46A3 の迅速かつ簡便な機能評価方法のための基質として、蛍光化合物である 5-CF が有用であることが示された。

## 総括

本研究では T-DM1 細胞内動態におけるリソソームトランスポーターの役割の解明および ADC 治療の最適化を目的として、SLC46A3 の機能同定および T-DM1 細胞内動態制御における役割に関する検討を行った。

第 1 章では、SLC46A3 の一次構造の解析により、C 末端領域にチロシンモチーフ配列を有することを見出し、この配列を含む C 末端領域の欠損により SLC46A3 が細胞膜へ局在することを明らかにした。SLC46A3 の C 末端領域を欠損させた変異体である SLC46A3 dC を安定発現させた MDCKII 細胞を作製し、本細胞を用いた各種有機アニオン化合物の細胞内取り込みスクリーニングにより、SLC46A3 が E<sub>1</sub>S を輸送することを明らかにした。また、SLC46A3 による E<sub>1</sub>S 輸送特性評価により、SLC46A3 が H<sup>+</sup>を輸送駆動力とすることを示した。様々な内因性化合物を用いた阻害実験から、SLC46A3 dC 介在性 E<sub>1</sub>S 輸送がステロイド抱合体および胆汁酸により顕著に阻害されることが示され、さらに直接の取り込み試験によりこれら化合物が SLC46A3 により輸送されることが明らかとなった。以上より、SLC46A3 が H<sup>+</sup>依存的なステロイド抱合体および胆汁酸トランスポーターであることが示された。

第 2 章では、T-DM1 の活性代謝物である Lys-SMCC-DM1 が SLC46A3 dC 発現細胞において顕著に取り込まれること、この取り込みが pH 依存性を示し、E<sub>1</sub>S により阻害されることを明らかにした。SLC46A3 dC 介在性 Lys-SMCC-DM1 取り込みは lysosomotropic drugs である clarithromycin、erythromycin および rifabutin により強力に阻害され、これら SLC46A3 阻害剤存在下において、T-DM1 作用時の細胞生存率が顕著に上昇することを示した。リソソームに残存する T-DM1 を免疫染色法により評価した結果、clarithromycin および rifabutin 作用群における残存 T-DM1 は対照群と同程度であり、clarithromycin および rifabutin はリソソームにおける T-DM1 の分解に影響しないことが示唆された。以上より、SLC46A3 はリソソームから細胞質への Lys-SMCC-DM1 輸送を担うことで、T-DM1 の薬効を制御することが示唆された。

第 3 章では、様々な蛍光化合物のスクリーニングにより、5-CF が SLC46A3 の良好な基質であることを見出した。SLC46A3 dC 介在性 5-CF 取り込みは、SLC46A3 の基質である E<sub>1</sub>S により阻害され、その阻害様式は競合阻害であることが示された。さらに、5-CF 取り込みは既知 SLC46A3 基質/阻害剤により有意に阻害され、その阻害率と E<sub>1</sub>S 取り込みに対する阻害率の間に良好な相関関係が認められた。5-CF を用いた SLC46A3 の機能評価系による ADC の payload として応用されている化合物のスクリーニングと、それに続く取り込み試験から SG3199 が SLC46A3 の基質であることが明らかとなり、SLC46A3 の迅速かつ簡便な機能評価方法のための基質として、蛍光化合物である 5-CF が有用であることが示された。

本研究で得られた成果は、T-DM1 細胞内動態制御因子としてのリソソームトランスポーターに関する新たな情報を提供し、ADC だけでなく、エンドサイトーシス経路を活用した DDS の最適化や開発に貢献するものと期待される。



## 実験の部

1. 実験材料
  - 1-1. 使用器具・試薬
  - 1-2. 実験細胞
  - 1-3. 使用機器
2. 緩衝液の組成と調製法
3. 遺伝子クローニング
  - 3-1. SLC46A3 発現プラスミドの作製
  - 3-2. オルガネラマーカ発現プラスミドの作製
4. 遺伝子導入および SLC46A3 dC 安定発現細胞の作製
5. 免疫染色
6. 取り込み試験
7. 細胞内銅定量
8. 細胞生存率アッセイ
9. T-DM1 免疫染色
10. LC-MS/MS
11. 解析
12. 統計処理

## 1. 実験材料

### 1-1. 使用器具・試薬

#### 使用薬物

<i>p</i> -Acetamidophenyl β-D-glucuronide	Sigma-Aldrich
6-Aminofluorescein (6-AF)	Sigma-Aldrich
Ansamitocin P-3	Cayman Chemical Company
L-Ascorbic acid	富士フイルム和光純薬
Bilirubin	富士フイルム和光純薬
D-Biotin	ナカライテスク
5-Carboxyfluorescein hydrate (5-CF)	東京化成工業
6-Carboxyfluorescein hydrate (6-CF)	東京化成工業
5-Carboxytetramethylrhodamine (5-TAMRA)	Cayman Chemical Company
Chloroquine diphosphate	東京化成工業
Cholesterol	富士フイルム和光純薬
Cholesterol sulfate sodium salt	Cayman Chemical Company
Cholic acid (CA)	富士フイルム和光純薬
Clarithromycin	東京化成工業
Clindamycin hydrochloride	BLD Pharmatech
Copper (II) chloride	富士フイルム和光純薬
Dehydroepiandrosterone	東京化成工業
Dehydroepiandrosterone sulfate sodium salt (DHEAS)	Cayman Chemical Company
Dibromofluorescein (DBF)	東京化成工業
2,7-Dichlorofluorescein (DCF)	ナカライテスク
Erythromycin	富士フイルム和光純薬
Estradiol 17-β-D-glucuronide sodium salt hydrate	Cayman Chemical Company
Estron sulfate, ammonium salt [6,7- <sup>3</sup> H (N)]	Perkin-Elmer
Estrone	富士フイルム和光純薬
Estrone 3-sulfate sodium salt	Sigma-Aldrich
Exatecan mesylate	MedChemExpress
Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate	東京化成工業
Fluorescein (FL)	富士フイルム和光純薬
Fluoresceinamine isomer I (5-aminofluorescein) (5-AF)	Santa Cruz Biotechnology
Folic acid	富士フイルム和光純薬

Glycocholic acid sodium salt (GCA)	BLD Pharmatech
Hemin	東京化成工業
Hydroxocobalamin acetate	富士フイルム和光純薬
Hydroxychloroquine sulfate	東京化成工業
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub>	Cayman Chemical Company
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> glucuronide	Toronto Research Chemicals
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> sulfate	Toronto Research Chemicals
Imipramine hydrochloride	東京化成工業
KADCYLA <sup>®</sup> (trastuzumab emtansine)	中外製薬
2-Ketoglutaric acid	ナカライテスク
Lys-SMCC-DM1 trifluoroacetate	InvivoChem
Mertansine (DM1)	Cayman Chemical Company
Methotrexate hydrate	東京化成工業
5-Methyltetrahydrofolic acid disodium salt	Sigma-Aldrich
4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide	Sigma-Aldrich
Monomethyl auristatin E	MedChemExpress
α-Naphthyl β-D-glucuronide	Sigma-Aldrich
Nicotinic acid	富士フイルム和光純薬
Nicotinic acid [ <sup>3</sup> H(G)]	American Radiolabeled Chemicals
Nigericin sodium salt	富士フイルム和光純薬
D-Pantothenic acid sodium salt	ナカライテスク
Palmitic acid [9,10- <sup>3</sup> H]	Perkin-Elmer
Pregnenolone	東京化成工業
Pregnenolone sulfate sodium salt	Cayman Chemical Company
Pyridoxal phosphate	富士フイルム和光純薬
Rhodamine 110	Santa Cruz Biotechnology
Rhodamine 123	富士フイルム和光純薬
Rhodol	Abcam
Riboflavin	ナカライテスク
Riboflavin 5'-monophosphate sodium salt	東京化成工業
Rifabutin	Cayman Chemical Company
SG3199	MedChemExpress
Sodium taurocholate (TCA)	富士フイルム和光純薬
Succinic anhydride	富士フイルム和光純薬
Sulfonfluorescein (SF)	東京化成工業
Sulforhodamine 101 (SR101)	Sigma-Aldrich
Thiamine pyrophosphate chloride	ナカライテスク

Uric acid 東京化成工業  
Uric acid [8-<sup>14</sup>C] American Radiolabeled Chemicals

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

遺伝子クローニング

KOD plus mutagenesis kit 東洋紡  
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix New England Biolabs  
mCh-Rab7A Addgene  
mCherry-Rab5a-7 Addgene  
pAcGFP1-Golgi vector タカラバイオ  
pAcGFP1-Mito vector タカラバイオ  
pCI-neo mammalian expression vector Promega  
pCW57-MCS1-P2A-MCS2 (Hygro) Addgene  
pDsRed2-Peroxi vector タカラバイオ  
pmKate2-C vector Evrogen  
pmKate2-N vector Evrogen  
pmNeonGreenHO-3×FLAG-G vector Addgene

遺伝子導入・安定発現細胞の作製

Hygromycin B 富士フイルム和光純薬  
Polyethylenimine (PEI) MAX (Mw 40,000) Polysciences

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

細胞内銅定量

Metallo Assay Low Concentration Copper Assay kit  
Metallogenics

取り込み試験

Pierce BCA protein assay kit  
Thermo Fisher Scientific

細胞生存率アッセイ

Cell Counting kit-8  
同仁化学研究所

T-DM1 染色

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

LC-MS/MS

Acetonitrile -Plus- LC/MS 用  
Ammonium acetate  
Formic acid  
Methanol -Plus- LC/MS 用  
関東化学  
富士フイルム和光純薬  
ナカライテスク  
関東化学

その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

1-2. 実験細胞

細胞株

HCC1954	JCRB 細胞バンク
HEK293T	ECACC
KPL-4	川崎医科大学
MDCKII	ECACC
SK-BR-3	JCRB 細胞バンク

KPL-4 細胞は川崎医科大学 紅林 淳一 教授よりご提供いただいた<sup>93)</sup>。

HEK293T、KPL-4、MDCKII 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。HCC1954、SK-BR-3 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% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

1-3. 使用機器

名称	型式	メーカー
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	Varioskan™	Thermo Fisher Scientific
プレートリーダー	Flash2.4 FP-6500	Thermonics
恒温槽	サーモボックス	Eppendorf
遠心機	Centrifuge 5415R	Thermo Fisher Scientific
CO <sub>2</sub> インキュベーター	FORMA DIRECT HEAT	東京理化機械
インキュベーター	EYELA SLI-220	TAITEC
恒温振とう機	Bioshaker BR-23FP	三商
卓上型アスピレーター	SAP-102	KEYENCE
蛍光顕微鏡	Biozero BZ-710	Olympus
共焦点	FV1000-D IX81	Olympus
レーザー走査型顕微鏡	FV3000 IX83	アステック
共焦点	GeneAtlas 322/325	アトー
レーザー走査型顕微鏡	WSE-1710	Waters
サーマルサイクラー	ACQUITY UPLC® H-Class - Xevo TQD system	Imtact
電気泳動装置	UNISON UK-C18 HT (3 × 30 mm, 3 μm)	GL Science
UPLC-MS システム	InertSustain C18 (2.1 × 100 mm, 5 μm)	Agilent Technologies
UPLC カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 5 μm) column	日本エマソン
UPLC カラム	Branson Branson® CPXH Digital Bath 3800	

## 2. 緩衝液の組成と調整法

### Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

Components	Final concentration (mM)
KCl	5.330
NaCl	136.900
NaHCO <sub>3</sub>	4.170
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.441
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.338
CaCl <sub>2</sub>	1.260
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.493

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.407
D-Glucose	5.560
Citrate (pH 4.0–4.5) or HEPES (pH 7.4) or MES (pH 5.0–6.5)	10.000

以上のように調製した HBSS を 1N HCl および 1N NaOH にて pH 4.0–7.4 に調整した。

### 3. 遺伝子クローニング

#### 3-1. SLC46A3 発現プラスミドの作製

ヒト SLC46A3 cDNA を PCR 法により増幅させ、pCI-neo ベクターへ導入した。3×FLAG-C-pCI-neo ベクターは、3×FLAG cDNA を pmNeonGreenHO-3×FLAG-G ベクターより増幅させ、pCI-neo ベクターのマルチクローニングサイト 3'領域側へ挿入することにより作製した。ヒト SLC46A3 cDNA を 3×FLAG-C-pCI-neo ベクターに導入し、SLC46A3-3×FLAG 発現プラスミド (SLC46A3-3×FLAG/pCI-neo) を作製した。SLC46A3 dC-3×FLAG および SLC46A3 AELA-3×FLAG は、KOD plus mutagenesis kit を用い、製品プロトコールに従って作製した。Hygromycin resistance (HygR)-T2A-SLC46A3 dC/pCI ベクターを構築するために、HygR-T2A、SLC46A3 dC および pCI の 3 フラグメントを下記のプライマーを用いて、pCW57-MCS1-P2A-MCS2、FLAG-SLC46A3 dC/pCI-neo および pCI ベクターからそれぞれ増幅させた。これらフラグメントを NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix を用いて、製品プロトコールに従いアッセンブルした。それぞれのベクターコンストラクトはシーケンシングにより確認した。使用したプライマーを以下に示す。

cDNA	Template cDNA			Sequences (5' to 3')
SLC46A3	Caco-2 cDNA	1 <sup>st</sup>	Forward	CTTGAGACTCCCCGACAAGC
		PCR	Reverse	ATTATCATGCCTGTCACCGAT
	1 <sup>st</sup> PCR product	2 <sup>nd</sup>	Forward	GGGGGAATTCCGCCGCCATGAAGATTTTATTTGTAGAACC
		PCR	Reverse	CCCCTCTAGATTAACAGGCTCTGTCTGAAGCATC
3×FLAG	pmNeonGreenHO- 3×FLAG-G vector		Forward	GGGGGTCGACTGGAGCCACCCGCAGTTCG
			Reverse	GGGGCGGCCGCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTG
SLC46A3 dC-3×FLAG	SLC46A3-3×FLAG/pCI- neo vector		Forward	TAATCTAGAGTCGACCCGGGCGGCC
			Reverse	GCTTCCCTCATTCCAGCTGGTACAC
HygR-T2A	pCW57-MCS1-P2A- MCS2 vector		Forward	CTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGCCGCGATGAAAAAGCCTGA
			Reverse	TGGACCAGGGTTTTCTTCAACATCACCACAAGTG
SLC46A3 dC	FLAG-SLC46A3 dC/pCI-neo vector		Forward	GTGGTGATGTTGAAGAAAACCCCTGGTCCAATGAAGATTTTATTTGTAGAAC
			Reverse	CAATGTATCTTATCATGTCTGCTCGAAGCTCAGCTTCCCTCATTCCAGCTGG
SLC46A3 AELA	SLC46A3-3×FLAG/pCI- neo vector		Forward	CTTGCTATAACAAGAAGAATCCAGTG
			Reverse	TTCAGCGCTTCCCTCATTCCAGCTGG
pCI	pCI vector		Forward	GCTTCGAGCAGACATGATAAG
			Reverse	CTGCAGCTTAAGTTCGAGAC



### 3-2. オルガネラマーカ発現プラスミドの作製

mCherry-Rab5a-7 および mCh-Rab7A ベクターは Addgene より入手した。LAMP1 および calnexin cDNA を pmKate2-N ベクターに導入した。Peroxisomal targeting signal 1 (PTS1)、N-terminal 81-amino acid human beta-1,4-galactosyltransferase [B4GALT (NT)] および mitochondrial targeting sequence (MTS) cDNA は、pDsRed2-Peroxi ベクター、pAcGFP1-Golgi ベクター および pAcGFP1-Mito ベクターからそれぞれ増幅させ、pmKate2-C ベクターへ導入した。

### 4. 遺伝子導入および SLC46A3 dC 安定発現細胞の作製

SLC46A3 および細胞内オルガネラマーカを一過性に発現させるために、HEK293T 細胞を 24-well プレートに  $1.5 \times 10^5$  cells/well で播種した。1 日後、1  $\mu\text{g}/\text{well}$  のプラスミドを 2  $\mu\text{g}/\text{well}$  の polyethylenimine (PEI) MAX (Mw 40,000) によりトランスフェクションした。免疫染色のために、トランスフェクションした細胞は 35 mm glass-bottom dishes に再播種し、2 日間培養した。SLC46A3 dC 安定発現 MDCKII 細胞を作製するために、HygR-T2A-SLC46A3 dC/pCI ベクターを PEI MAX (3  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) を用いてトランスフェクションし、10% FBS および hygromycin (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含有する DMEM で 2 週間培養した。得られた hygromycin 耐性クローンを SLC46A3 dC 安定発現 MDCKII 細胞として使用した。

### 5. 免疫染色

SLC46A3-3 $\times$ FLAG、SLC46A3 dC-3 $\times$ FLAG /pCI-neo ベクター およびオルガネラマーカ発現ベクターをトランスフェクションした細胞を PBS で 2 回リンスし、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS で 15 分間固定した。PBS で 2 回洗浄後、0.25% TritonX-100 を含む PBS で 5 分間透過処理を行った。その後、PBS で 2 回洗浄し、10% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS で 30 分間 (37°C) ブロッキングした。細胞に抗 FLAG 抗体 (1:500) を 4°C で一晩作用させた。その後、細胞を PBS-T で 2 回洗浄し、抗マウス 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 FV3000 で画像を取得した。

### 6. 取り込み試験

細胞を 24-well プレート ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) に播種し、2 日間培養した。細胞を 500  $\mu\text{L}$  の HBSS で 3 分間プレインキュベーションし、300  $\mu\text{L}$  の被験化合物を含む HBSS で規定の時間作用させた。取り込みは 1 mL の ice-cold HBSS (pH 7.4) を添加することで反応を止めた。さらに、2 mL の HBSS で細胞を 2 回洗浄した。25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> sulfate 取り込み試験においては、1.5% BSA を含む ice-cold HBSS で洗いを行った。取り込み試験後、<sup>3</sup>Hラベルした化合物の取り込みにおい

では、0.1% TritonX-100 を含む 0.3N NaOH 水溶液 (cell lysis solution) により細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。他の薬物においては、内標準物質を含む 300  $\mu$ L の 50%アセトニトリル水溶液 (DM1、Lys-SMCC-DM1 および SG3199) あるいは 500  $\mu$ L の 50%メタノール水溶液で室温にて 30 分間作用させ、薬物を抽出した。抽出液は 0.2  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過し、LC-MS/MS で定量した。並行して、同様の条件で培養した細胞を cell lysis solution で溶解し、BCA 法にてタンパク量を定量した。取り込み量は細胞のタンパク量で補正した。

蛍光化合物の取り込みにおいては、細胞を 96-well プレート ( $2.0 \times 10^4$  cells/well) に播種し、2 日間培養した。150  $\mu$ L の HBSS でプレインキュベーションした後、100  $\mu$ L の蛍光化合物を含む HBSS を 37°C で規定時間作用させた。その後、ice-cold HBSS を添加し、反応を止め、さらに 2 回洗浄した。取り込み試験後、細胞内の蛍光化合物を定量するために、細胞を 200  $\mu$ L の cell lysis solution で溶解し、マイクロプレートリーダーで直接蛍光強度を測定した。Rh123 および Rh110 は塩基性よりも中性で蛍光強度が高いため、0.3N HCl でサンプルを中和した後、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。測定に使用した波長は以下に示す。

Fluorescent compounds	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
5-TAMRA	547	574
Fluorescein derivatives	492	518
Rh110	496	520
Rh123	507	529
Rhodol	490	530
SR101	588	604
SF	496	514

## 7. 細胞内銅定量

細胞外 copper (II) chloride (40  $\mu$ M) 存在下および非存在下、細胞 ( $1.5 \times 10^6$  cells/flask) を T75 フラスコで 1 日培養した。細胞を回収し、1N NaOH 水溶液で溶解した後、銅濃度を Metallo Assay Low Concentration Copper Assay kit を用いて、製品プロトコールに従い測定した。タンパク量を BCA 法により定量し、細胞内の銅蓄積量を細胞タンパク量で補正した。

## 8. 細胞生存率アッセイ

細胞を 3,000 cell/well で 96-well プレートに播種した。次の日、被験化合物存在下および非存在下、T-DM1 (0、0.01 および 0.03  $\mu$ g/mL) を作用させた。4 日後、細胞生存率を Cell Counting kit-8 を用いて製品プロトコールに従い測定した。450

nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、T-DM1 非作用群を 100%として、細胞生存率を算出した。

## 9. T-DM1 免疫染色

HCC1954 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  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  $\mu\text{M}$ )、clarithromycin (30 $\mu\text{M}$ )、imipramine (30  $\mu\text{M}$ ) および rifabutin (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。

## 10. LC-MS/MS

細胞内取り込み試験のサンプルは以下の条件で測定した。

### Measurement conditions

#### Methotrexate (内標準物質: Antipyrine)

#### LC

Measurement time	4.5 min
Mobile phase	A: 100% - B: 0% (0–0.7 min) → A: 5% - B: 95%
A: 0.1% Formic acid	(0.7–1.5 min) → A: 5% - B: 95% (1.5–3.4 min) →
B: Acetonitrile	A: 100% - B: 0% (3.4–3.5 min) → A: 100% - B: 0% (3.5–4.5 min)
Injection volume	5 $\mu\text{L}$
Column temp.	35°C
Sample temp.	4°C
Flow rate	0.2 mL/min
Column	UNISON UK-C18 HT (3 × 30 mm, 3 $\mu\text{m}$ ) column

#### MS

Measurement time	4.5 min
Source Voltages	
Capillary	3.00 kV
Source Temperatures	
Desolvation Temp	500°C
Source Gas Flow	
Desolvation	1000 L/Hr

Cone 50 L/hr

MRM

Compounds	Ion mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	Collision (V)
Methotrexate	ES+	455.2	308.0	52	18
Antipyrine	ES+	189.1	131.0	46	22

DHEAS、pregnenolone sulfate、25-hydroxyvitamin D3 sulfate

(内標準物質: Estrone 3-sulfate)

LC

Measurement time	6.5 min
Mobile phase A: 10 mM ammonium acetate (pH 4.5) B: Methanol	A: 70% - B: 30% (0–1 min) → A: 5% - B: 95% (1–2 min) → A: 5% - B: 95% (2–5 min) → A: 70% - B: 30% (5–5.1 min) → A: 70% - B: 30% (5.1–6.5 min)
Injection volume	5 µL
Column temp.	35°C
Sample temp.	4°C
Flow rate	0.2 mL/min
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 5 µm) column

MS

Measurement time	6.5 min
Source Voltages Capillary	-3.00 kV
Source Temperatures Desolvation Temp	350°C
Source Gas Flow Desolvation Cone	1000 L/Hr 50 L/hr

MRM

Compounds	Ion mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	CE (V)
DHEAS	ES-	367.1	97.0	60	44
Pregnenolone sulfate	ES-	395.1	97.0	60	38
25-Hydroxyvitamin D3 sulfate	ES-	479.3	97.0	66	34
Estrone 3-sulfate	ES-	349.1	269.3	60	34

CA、GCA、TCA (内標準物質: Estrone 3-sulfate)

LC

Measurement time	7 min
Mobile phase	A: 90% - B: 10% (0–0.5 min) → A: 5% - B: 95% A: 10 mM ammonium acetate (pH 4.5) B: Methanol
Injection volume	5 µL
Column temp.	35°C
Sample temp.	4°C
Flow rate	0.2 mL/min
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 5 µm) column

MS

Measurement time	7 min
Source Voltages	
Capillary	-3.00 kV
Source Temperatures	
Desolvation Temp	350°C
Source Gas Flow	
Desolvation	1000 L/Hr
Cone	50 L/hr

MRM

Compounds	Ion mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	CE (V)
CA	ES-	407.3	343.3	60	34
GCA	ES-	464.3	74.0	60	40

TCA	ES-	514.2	80.0	98	78
Estrone 3-sulfate	ES-	349.1	269.3	60	34

DM1、Lys-SMCC-DM1 (内標準物質: Ansamitocin P-3)

LC

Measurement time	8 min
Mobile phase	A: 95% - B: 5% (0–0.5 min) → A: 5% - B: 95% A: 0.1% Formic acid (0.5–3 min) → A: 5% - B: 95% (3–6.5 min) → A: B: 0.1% Formic acid in 95% - B: 5% (6.5–6.6 min) → A: 95% - B: 5% (6.6– acetonitrile 8 min)
Injection volume	5 µL
Column temp.	35°C
Sample temp.	4°C
Flow rate	0.2 mL/min
Column	InertSustain C18 (2.1 × 100 mm, 5 µm) column

MS

Measurement time	8 min
Source Voltages	
Capillary	3.00 kV
Source Temperatures	
Desolvation Temp	350°C
Source Gas Flow	
Desolvation	1000 L/Hr
Cone	50 L/hr

MRM

Compounds	Ion mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	CE (V)
DM1	ES+	738.5	547.5	32	30
Lys-SMCC-DM1	ES+	1103.2	485.2	54	38
Ansamitocin P-3	ES+	635.2	547.2	48	22

Clarithromycin、erythromycin、hydroxychloroquine、imipramine、rifabutin  
(内標準物質: Antipyrine)

## LC

Measurement time	8 min
Mobile phase	A: 95% - B: 5% (0–0.5 min) → A: 5% - B: 95% A: 0.1% Formic acid (0.5–3 min) → A: 5% - B: 95% (3–5.5 min) → A: B: Acetonitrile 95% - B: 5% (5.5–5.6 min) → A: 95% - B: 5% (5.6– 8 min)
Injection volume	5 µL
Column temp.	35°C
Sample temp.	4°C
Flow rate	0.2 mL/min
Column	InertSustain C18 (2.1 × 100 mm, 5 µm) column

## MS

Measurement time	8 min
Source Voltages	
Capillary	3.00 kV
Source Temperatures	
Desolvation Temp	350°C
Source Gas Flow	
Desolvation	1000 L/Hr
Cone	50 L/hr

## MRM

Compounds	Ion mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	CE (V)
Clarithromycin	ES+	748.4	158.1	42	32
Erythromycin	ES+	734.4	158.1	34	32
Hydroxychloroquine	ES+	336.0	247.1	50	20
Imipramine	ES+	281.1	86.0	28	16
Rifabutin	ES+	847.4	815.3	48	26
Antipyrine	ES+	189.1	131.0	46	22

Estradiol 17β-D-glucuronide、25-hydroxyvitamin D3 glucuronide

(内標準物質: Estrone 3-sulfate)

## LC

Measurement time	7.8 min
------------------	---------

Mobile phase	A: 70% - B: 30% (0–0.5 min) → A: 5% - B: 95% A: 10 mM ammonium acetate (pH 4.5) B: Methanol
Injection volume	5 µL
Column temp.	35°C
Sample temp.	4°C
Flow rate	0.2 mL/min
Column	InertSustain C18 (2.1 × 100 mm, 5 µm) column

#### MS

Measurement time	7.8 min
Source Voltages	
Capillary	-3.00 kV
Source Temperatures	
Desolvation Temp	350°C
Source Gas Flow	
Desolvation	1000 L/Hr
Cone	50 L/hr

#### MRM

Compounds	Ion mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	CE (V)
Estradiol 17β-D-glucuronide	ES-	447.0	85.0	54	30
25-Hydroxyvitamin D3 glucuronide	ES-	575.2	113.0	66	34
Estrone 3-sulfate	ES-	349.1	269.3	60	34

#### SG3199 (内標準物質: Ansamitocin P-3)

#### LC

Measurement time	9 min
Mobile phase	A: 90% - B: 10% (0–1 min) → A: 5% - B: 95% (1–1.5 min) → A: 5% - B: 95% (1.5–7 min) → A: 95% - B: 5% (7–7.1 min) → A: 95% - B: 5% (7.1–9 min)
Injection volume	5 µL
Column temp.	35°C
Sample temp.	4°C



Flow rate	0.2 mL/min
Column	InertSustain C18 (2.1 × 100 mm, 5 μm) column

#### MS

Measurement time	9 min
Source Voltages	
Capillary	3.00 kV
Source Temperatures	
Desolvation Temp	500°C
Source Gas Flow	
Desolvation	1000 L/Hr
Cone	50 L/hr

#### MRM

Compounds	Ion mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	CE (V)
SG3199	ES+	585.2	504.2	34	20
Ansamitocin P-3	ES+	635.2	547.2	48	22

## 11. 解析

すべての回帰分析は GraphPad Prism v9.4.1 で行った。トランスポーター特異的な取り込みは、SLC46A3 dC 発現細胞における取り込み量から 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。トランスポーター特異的な取り込みの濃度依存性試験のデータは、ミカエリス・メンテン式に当てはめて  $K_m$  および  $V_{max}$  値を算出した。

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

$v$ : 取り込み速度、 $S$ : 基質濃度

IC<sub>50</sub> 値は以下の式を用いて算出した。

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

uptake<sub>top</sub>: 最大取り込み率、uptake<sub>min</sub>: 最小取り込み率、*I*: 阻害剤濃度

## 12. 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 Dunnet's test を用いた。 $P < 0.05$  を有意水準とした。

## 掲載論文

- (1) SLC46A3 is a lysosomal proton-coupled steroid conjugate and bile acid transporter involved in transport of active catabolites of T-DM1. Ryuto Tomabechei, Hisanao Kishimoto, Taeka Sato, Naoki Saito, Keisuke Kiyomiya, Tappei Takada, Kei Higuchi, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue, *PNAS Nexus*, **1**, pgac063 (2022).
- (2) Identification of 5-carboxyfluorescein as a probe substrate of SLC46A3 and its application in a fluorescence-based in vitro assay evaluating the interaction with SLC46A3. Ryuto Tomabechei, Miki Miyasato, Taeka Sato, Tappei Takada, Kei Higuchi, Hisanao Kishimoto, Yoshiyuki Shirasaka, and Katsuhisa Inoue, *Molecular Pharmaceutics*, **20**, 491–499 (2023).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究に対する基本的な考え方から創造性に満ちた考え方までを御教授いただき、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、鋭く的確な御助言を賜り、研究以外でも多くの御支援を賜りました金沢大学 医薬保健研究域薬学系 白坂 善之准教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、丁寧な御指導、御助言を頂き、研究室配属当初から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、広い視野から鋭く的確な御指導、御助言を賜りました東京薬科大学 薬学部 樋口 慧助教に厚く御礼申しあげます。

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。

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清宮 啓介学士、佐藤 妙華学士、宮里 美希学士、齊藤 直希さん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、常に私を信じ、温かく見守り、支えてくれた家族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 5 年 1 月  
苫米地 隆人

## 引用文献

- 1) 鍵井 英之, 「次世代創薬基盤技術の導入と構築に関する研究」 リサーチペーパー・シリーズ No. 77, 2021.
- 2) 戸邊 雅則, 「創薬化学の側面から見た低分子医薬の将来像 —低分子から中分子への広がり—」 リサーチペーパー・シリーズ No. 72, 2018.
- 3) Muralidhara B. K., Wong M., *Drug Discov. Today*, **25**, 574–581 (2020).
- 4) Doherty G. J., McMahon H. T., *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 857–902 (2009).
- 5) Xu H., Ren D., *Annu. Rev. Physiol.*, **77**, 57–80 (2015).
- 6) Bonam S. R., Wang F., Muller S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 923–948 (2019).
- 7) Coats S., Williams M., Kebble B., Dixit R., Tseng L., Yao N. S., Tice D. A., Soria J. C., *Clin. Cancer Res.*, **25**, 5441–5448 (2019).
- 8) Chau C. H., Steeg P. S., Figg W. D., *Lancet*, **394**, 793–804 (2019).
- 9) Tsuchikama K., An Z., *Protein Cell*, **9**, 33–46 (2018).
- 10) Khongorzul P., Ling C. J., Khan F. U., Ihsan A. U., Zhang J., *Mol. Cancer Res.*, **18**, 3–19 (2020).
- 11) Lewis Phillips G. D., Li G., Dugger D. L., Crocker L. M., Parsons K. L., Mai E., Blättler W. A., Lambert J. M., Chari R. V. J., Lutz R. J., Wong W. L. T., Jacobson F. S., Koeppen H., Schwall R. H., Kenkare-Mitra S. R., Spencer S. D., Sliwkowski M. X., *Cancer Res.*, **68**, 9280–9290 (2008).
- 12) Pegram M. D., Miles D., Kimberly Tsui C., Zong Y., *Clin. Cancer Res.*, **26**, 775–786 (2020).
- 13) Junttila T. T., Li G., Parsons K., Phillips G. L., Sliwkowski M. X., *Breast Cancer Res. Treat.*, **128**, 347–356 (2011).
- 14) Barok M., Tanner M., Köninki K., Isola J., *Breast Cancer Res.*, **13**, 1–11 (2011).
- 15) Verma S., Miles D., Gianni L., Krop I. E., Welslau M., Baselga J., Pegram M., Oh D.-Y., Diéras V., Guardino E., Fang L., Lu M. W., Olsen S., Blackwell K., *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1783–1791 (2012).
- 16) Ogitani Y., Hagihara K., Oitate M., Naito H., Agatsuma T., *Cancer Sci.*, **107**, 1039–1046 (2016).
- 17) Pizzagalli M. D., Bensimon A., Superti-Furga G., *FEBS J.*, **288**, 2784–2835 (2021).
- 18) El-Gebali S., Bentz S., Hediger M. A., Anderle P., *Mol. Aspects Med.*, **34**, 719–734 (2013).
- 19) Wang W. W., Gallo L., Jadhav A., Hawkins R., Parker C. G., *J. Med. Chem.*, **63**, 3834–3867 (2020).
- 20) Lin L., Yee S. W., Kim R. B., Giacomini K. M., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **14**,

- 543–560 (2015).
- 21) Giacomini K. M., Huang S. M., Tweedie D. J., Benet L. Z., Brouwer K. L. R., Chu X., Dahlin A., Evers R., Fischer V., Hillgren K. M., Hoffmaster K. A., Ishikawa T., Keppler D., Kim R. B., Lee C. A., Niemi M., Polli J. W., Sugiyama Y., Swaan P. W., Ware J. A., Wright S. H., Wah Yee S., Zamek-Gliszczyński M. J., Zhang L., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 215–236 (2010).
  - 22) Rudnik S., Damme M., *FEBS J.*, **288**, 4168–4182 (2021).
  - 23) Abu-Remaileh M., Wyant G. A., Kim C., Laqtom N. N., Abbasi M., Chan S. H., Freinkman E., Sabatini D. M., *Science*, **358**, 807–813 (2017).
  - 24) Lawrence R. E., Zoncu R., *Nat. Cell Biol.*, **21**, 133–142 (2019).
  - 25) Nakamura N., Lill J. R., Phung Q., Jiang Z., Bakalarski C., De Mazière A., Klumperman J., Schlatter M., Delamarre L., Mellman I., *Nature*, **509**, 240–244 (2014).
  - 26) Baldwin S. A., Yao S. Y. M., Hyde R. J., Ng A. M. L., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M. W. L., Cass C. E., Young J. D., *J. Biol. Chem.*, **280**, 15880–15887 (2005).
  - 27) He M., Kuk A. C. Y., Ding M., Chin C. F., Galam D. L. A., Nah J. M., Tan B. C., Yeo H. L., Chua G. L., Benke P. I., Wenk M. R., Ho L., Torta F., Silver D. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **119**, e2210353119 (2022).
  - 28) Akino S., Yasujima T., Yamashiro T., Yuasa H., *Life Sci. alliance*, **6**, 1–11 (2023).
  - 29) van Veen S., Martin S., Van den Haute C., Benoy V., Lyons J., Vanhoutte R., Kahler J. P., Decuypere J.-P., Gelders G., Lambie E., Zielich J., Swinnen J. V., Annaert W., Agostinis P., Ghesquière B., Verhelst S., Baekelandt V., Eggermont J., Vangheluwe P., *Nature*, **578**, 419–424 (2020).
  - 30) Verdon Q., Boonen M., Ribes C., Jadot M., Gasnier B., Sagné C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, E3602–E3611 (2017).
  - 31) Jézégou A., Llinares E., Anne C., Kieffer-Jaquinod S., O'Regan S., Aupetit J., Chabli A., Sagné C., Debacker C., Chadefaux-Vekemans B., Journet A., André B., Gasnier B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, E3434–E3443 (2012).
  - 32) Morin P., Sagné C., Gasnier B., *EMBO J.*, **23**, 4560–4570 (2004).
  - 33) Liu B., Du H., Rutkowski R., Gartner A., Wang X., *Science*, **337**, 351–354 (2012).
  - 34) Kalatzis V., Cherqui S., Antignac C., Gasnier B., *EMBO J.*, **20**, 5940–5949 (2001).
  - 35) Yamagishi T., Sahni S., Sharp D. M., Arvind A., Jansson P. J., Richardson D. R., *J. Biol. Chem.*, **288**, 31761–31771 (2013).

- 36) Aizawa S., Contu V. R., Fujiwara Y., Hase K., Kikuchi H., Kabuta C., Wada K., Kabuta T., *Autophagy*, **13**, 218–222 (2017).
- 37) Cuervo A. M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 535–541 (2011).
- 38) Mittendorf E. A., Wu Y., Scaltriti M., Meric-Bernstam F., Hunt K. K., Dawood S., Esteva F. J., Buzdar A. U., Chen H., Eksambi S., Hortobagyi G. N., Baselga J., Gonzalez-Angulo A. M., *Clin. Cancer Res.*, **15**, 7381–7388 (2009).
- 39) Loganzo F., Tan X., Sung M., Jin G., Myers J. S., Melamud E., Wang F., Diesl V., Follettie M. T., Musto S., Lam M. H., Hu W., Charati M. B., Khandke K., Kim K. S. K., Cinque M., Lucas J., Graziani E., Maderna A., O'Donnell C. J., Arndt K. T., Gerber H. P., *Mol. Cancer Ther.*, **14**, 952–963 (2015).
- 40) Baldassarre T., Truesdell P., Craig A. W., *Breast Cancer Res.*, **19**, 1–15 (2017).
- 41) Ríos-Luci C., García-Alonso S., Díaz-Rodríguez E., Nadal-Serrano M., Arribas J., Ocaña A., Pandiella A., *Cancer Res.*, **77**, 4639–4651 (2017).
- 42) Wang H., Wang W., Xu Y., Yang Y., Chen X., Quan H., Lou L., *Cancer Sci.*, **108**, 1458–1468 (2017).
- 43) Sung M., Tan X., Lu B., Golas J., Hosselet C., Wang F., Tylaska L., King L., Zhou D., Dushin R., Myers J. S., Rosfjord E., Lucas J., Gerber H. P., Loganzo F., *Mol. Cancer Ther.*, **17**, 243–253 (2018).
- 44) Li G., Guo J., Shen B. Q., Yadav D. B., Sliwkowski M. X., Crocker L. M., Lacap J. A., Phillips G. D. L., *Mol. Cancer Ther.*, **17**, 1441–1453 (2018).
- 45) Sabbaghi M. A., Gil-Gomez G., Guardia C., Servitja S., Arpi O., García-Alonso S., Menendez S., Arumi-Uria M., Serrano L., Salido M., Muntasell A., Martínez-García M., Zazo S., Chamizo C., Gonzalez-Alonso P., Madoz-Gurpide J., Eroles P., Arribas J., Tusquets I., Lluch A., Pandiella A., Rojo F., Rovira A., Albanell J., *Clin. Cancer Res.*, **23**, 7006–7019 (2017).
- 46) 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).
- 47) 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).
- 48) Kovtun Y. V., Audette C. A., Ye Y., Xie H., Ruberti M. F., Phinney S. J., Leece B. A., Chittenden T., Blättler W. A., Goldmacher V. S., *Cancer Res.*, **66**, 3214–3221 (2006).
- 49) García-Alonso S., Ocaña A., Pandiella A., *Cancer Res.*, **78**, 2159–2165 (2018).

- 50) Zhao R., Goldman I. D., *Mol. Aspects Med.*, **34**, 373–385 (2013).
- 51) 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).
- 52) 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., *Nat. Commun.*, **12**, 1–12 (2021).
- 53) Boehnke N., Straehla J. P., Safford H. C., Kocak M., Rees M. G., Ronan M., Rosenberg D., Adelman C. H., Chivukula R. R., Nabar N., Berger A. G., Lamson N. G., Cheah J. H., Li H., Roth J. A., Koehler A. N., Hammond P. T., *Science*, **377**, eabm5551 (2022).
- 54) Bonifacino J. S., Traub L. M., *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 395–447 (2003).
- 55) Qiu A., Jansen M., Sakaris A., Min S. H., Chattopadhyay S., Tsai E., Sandoval C., Zhao R., Akabas M. H., Goldman I. D., *Cell*, **127**, 917–928 (2006).
- 56) Nakai Y., Inoue K., Abe N., Hatakeyama M., Ohta K. Y., Otagiri M., Hayashi Y., Yuasa H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322**, 469–476 (2007).
- 57) Mindell J. A., *Annu. Rev. Physiol.*, **74**, 69–86 (2012).
- 58) Leuthold S., Hagenbuch B., Mohebbi N., Wagner C. A., Meier P. J., Stieger B., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **296**, C570–C582 (2009).
- 59) Sekine T., Miyazaki H., Endou H., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **290**, F251–F261 (2006).
- 60) Claro da Silva T., Polli J. E., Swaan P. W., *Mol. Aspects Med.*, **34**, 252–269 (2013).
- 61) Jutabha P., Anzai N., Kitamura K., Taniguchi A., Kaneko S., Yan K., Yamada H., Shimada H., Kimura T., Katada T., Fukutomi T., Tomita K., Urano W., Yamanaka H., Seki G., Fujita T., Moriyama Y., Yamada A., Uchida S., Wempe M. F., Endou H., Sakurai H., *J. Biol. Chem.*, **285**, 35123–35132 (2010).
- 62) Chapel A., Kieffer-Jaquinod S., Sagné C., Verdon Q., Ivaldi C., Mellal M., Thirion J., Jadot M., Bruley C., Garin J., Gasnier B., Journet A., *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 1572–1588 (2013).
- 63) Wong T., Wang Z., Chapron B. D., Suzuki M., Claw K. G., Gao C., Foti R. S., Prasad B., Chapron A., Calamia J., Chaudhry A., Schuetz E. G., Horst R. L., Mao Q., de Boer I. H., Thornton T. A., Thummel K. E., *Drug Metab. Dispos.*, **46**, 367–379 (2018).
- 64) Puche R. C., Nes W. R., *Endocrinology*, **70**, 857–863 (1962).
- 65) Willnow T. E., Nykjaer A., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **316**, 93–102 (2010).
- 66) Tsui C. K., Barfield R. M., Fischer C. R., Morgens D. W., Li A., Smith B. A. H., Gray M. A., Bertozzi C. R., Rabuka D., Bassik M. C., *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 949–



- 958 (2019).
- 67) de Duve C., de Barsey T., Poole B., Trouet a, Tulkens P., Van Hoof F., *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2495–2531 (1974).
  - 68) Schmitt M. V., Lienau P., Fricker G., Reichel A., *Drug Metab. Dispos.*, **47**, 49–57 (2019).
  - 69) Norinder U., Tuck A., Norgren K., Munic Kos V., *Biomed. Pharmacother.*, **130**, 110582 (2020).
  - 70) Collins K. P., Witta S., Coy J. W., Pang Y., Gustafson D. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **376**, 294–305 (2021).
  - 71) Nilsson C., Roberg K., Grafström R. C., Ollinger K., *Head Neck*, **32**, 1185–94 (2010).
  - 72) Volpe D. A., *Expert Opin. Drug Discov.*, **11**, 91–103 (2016).
  - 73) Dvorak V., Wiedmer T., Ingles-Prieto A., Altermatt P., Batoulis H., Bärenz F., Bender E., Digles D., Dürrenberger F., Heitman L. H., IJzerman A. P., Kell D. B., Kicking S., Körzö D., Leippe P., Licher T., Manolova V., Rizzetto R., Sassone F., Scarabottolo L., Schlessinger A., Schneider V., Sijben H. J., Steck A. L., Sundström H., Tremolada S., Wilhelm M., Wright Muelas M., Zindel D., Stepan C. M., Superti-Furga G., *Front. Pharmacol.*, **12**, 1–31 (2021).
  - 74) Ludescher C., Gattringer C., Drach J., Hofmann J., Grunicke H., Berman E., *Blood*, **78**, 1385–1387 (1991).
  - 75) Hu G., Henke A., Karpowicz R. J., Sonders M. S., Farrimond F., Edwards R., Sulzer D., Sames D., *ACS Chem. Biol.*, **8**, 1947–1954 (2013).
  - 76) Fardel O., Le Vee M., Jouan E., Denizot C., Parmentier Y., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **11**, 1233–1251 (2015).
  - 77) Landowski C. P., Han H. K., Lee K. D., Amidon G. L., *Pharm. Res.*, **20**, 1738–1745 (2003).
  - 78) Yasujima T., Ohta K., Inoue K., Yuasa H., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 4006–4012 (2011).
  - 79) Wittwer M. B., Zur A. A., Khuri N., Kido Y., Kosaka A., Zhang X., Morrissey K. M., Sali A., Huang Y., Giacomini K. M., *J. Med. Chem.*, **56**, 781–795 (2013).
  - 80) Bakos É., Németh O., Patik I., Kucsma N., Várady G., Szakács G., Özvegy-Laczka C., *FEBS J.*, **287**, 2468–2485 (2020).
  - 81) Kawasaki T., Shiozaki Y., Nomura N., Kawai K., Uwai Y., Nabekura T., *Pharm. Res.*, **37**, 115 (2020).
  - 82) Yee S. W., Stecula A., Chien H.-C., Zou L., Feofanova E. V., van Borselen M., Cheung K. W. K., Yousri N. A., Suhre K., Kinchen J. M., Boerwinkle E., Irannejad R., Yu B., Giacomini K. M., *PLoS Genet.*, **15**, e1008208 (2019).

- 83) Truong D. M., Kaler G., Khandelwal A., Swaan P. W., Nigam S. K., *J. Biol. Chem.*, **283**, 8654–8663 (2008).
- 84) Kusuhara H., Sekine T., Utsunomiya-Tate N., Tsuda M., Kojima R., Cha S. H., Sugiyama Y., Kanai Y., Endou H., *J. Biol. Chem.*, **274**, 13675–13680 (1999).
- 85) Klonis N., Sawyer W. H., *J. Fluoresc.*, **6**, 147–57 (1996).
- 86) Tamai I., Nezu J. I., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 251–260 (2000).
- 87) Tamura Z., Morioka T., Maeda M., Tsuji A., *Bunseki Kagaku*, **43**, 339–346 (1994).
- 88) Nieskens T. T. G., Peters J. G. P., Schreurs M. J., Smits N., Woestenenk R., Jansen K., van der Made T. K., Röring M., Hilgendorf C., Wilmer M. J., Masereeuw R., *AAPS J.*, **18**, 465–475 (2016).
- 89) Tiberghien A. C., Levy J. N., Masterson L. A., Patel N. V., Adams L. R., Corbett S., Williams D. G., Hartley J. A., Howard P. W., *ACS Med. Chem. Lett.*, **7**, 983–987 (2016).
- 90) Izumi S., Nozaki Y., Komori T., Takenaka O., Maeda K., Kusuhara H., Sugiyama Y., *Mol. Pharm.*, **13**, 438–448 (2016).
- 91) Hartley J. A., Flynn M. J., Bingham J. P., Corbett S., Reinert H., Tiberghien A., Masterson L. A., Antonow D., Adams L., Chowdhury S., Williams D. G., Mao S., Harper J., Havenith C. E. G., Zammarchi F., Chivers S., Van Berkel P. H., Howard P. W., *Sci. Rep.*, **8**, 1–11 (2018).
- 92) Bose D. S., Thompson A. S., Ching J., Hartley J. A., Berardini M. D., Jenkins T. C., Neidle S., Hurley L. H., Thurston D. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4939–4941 (1992).
- 93) Kurebayashi J., Otsuki T., Tang C. K., Kurosumi M., Yamamoto S., Tanaka K., Mochizuki M., Nakamura H., Sonoo H., *Br. J. Cancer*, **79**, 707–717 (1999).