

氏名（本籍）	<small>とまべち</small> 苫米地 <small>りゅうと</small> 隆人（青森県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 331 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 17 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	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
論文審査委員	（主査）教授 井上 勝央 教授 高木 教夫 教授 降幡 知巳

論文内容の要旨

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ており、近年では、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。

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。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、初期エンドソームに移行し、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。

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、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。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。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。

Trastuzumab emtansine (T-DM1) は、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (HER2) 陽性転移性乳がんの治療薬として開発された ADC であり、世界的に臨床で広く使用さ

れている。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、リジンおよびリンカーが payload に結合した 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 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。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。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。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 リソソーム膜タンパク質 SLC46A3 の機能同定

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。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。さらに、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。本章では、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。

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 末端領域の欠損させた SLC46A3 (SLC46A3 dC) を作製し、その細胞内局在を調べた結果、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 [³H]estrone 3-sulfate (E₁S) 取り込みが顕著に増大した。SLC46A3 dC 介在性 E₁S 取り込みは、細

胞外 pH 依存的であり、pH の低下に伴い上昇した。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。SLC46A3 の基質認識性を検討するために、様々な内因性化合物による阻害実験を行った結果、E₁S 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⁺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

第 1 章において、SLC46A3 が H⁺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。

SLC46A3 dC 発現細胞および mock 細胞における Lys-SMCC-DM1 取り込み実験を行った結果、Lys-SMCC-DM1 の細胞内取り込みは mock 細胞と比較し SLC46A3 dC 発現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 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、E₁S 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 E₁S により阻害された。逆に、SLC46A3 dC 介在性 E₁S 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とから、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

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。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、 $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ 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、高い感度とスループット性を有する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。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。

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-carboxyfluorescein (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。この 5-CF 取り込みは、SLC46A3 の基質である E_1S 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_1S 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。さらに、SG3199 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、SLC46A3 が H⁺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。また、T-DM1 活性代謝物である Lys-SMCC-DM1 を直接輸送すること、SLC46A3 阻害剤により T-DM1 の有効性が顕著に低下することを示し、T-DM1 細胞内動態において、SLC46A3 がリソソームから細胞質内へ Lys-SMCC-DM1 を輸送することで薬効制御に関わることを明らかにした。さらに、SLC46A3 の基質として蛍光化合物である 5-CF を同定し、迅速かつ簡便な機能評価方法のためのプローブとして有用であることを示した。以上、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。

【研究結果の掲載誌】

- 1). R. Tomabechi, H. Kishimoto, T. Sato, N. Saito, K. Kiyomiya, T. Takada, K. Higuchi, Y. Shirasaka, K. Inoue, *PNAS Nexus*, **1**, pgac063 (2022).
- 2). R. Tomabechi, M. Miyasato, T. Sato, T. Takada, K. Higuchi, H. Kishimoto, Y. Shirasaka, K. Inoue, *Molecular Pharmaceutics*, **20**, 491–499 (2023).

【論文審査の結果の要旨】

本申請論文は、リソソームに発現する機能未知の膜タンパク質である SLC46A3 について、トランスポーターとしての機能同定とその機能評価法、および trastuzumab emtansine (T-DM1) の薬効発現における役割についてまとめたものである。

抗体-薬物複合体 (ADC) はがん細胞特異的な薬物送達を可能にする創薬モダリティとして臨床応用されているが、その細胞内動態の詳細は不明である。HER2 陽性転移性乳がんに対する ADC である T-DM1 は、乳がん細胞表面に発現する HER2 に結合後、エンドサイトーシスにより内在化され、リソソームでの分解を経て、殺細胞活性を有する Lys-SMCC-DM1 を遊離する。その薬効発現にはリソソームから細胞質への Lys-SMCC-DM1 の移行が必須であるが、その分子メカニズムは不明であった。一方、T-DM1 の薬効発現と関連する遺伝子として、リソソーム膜タンパク質をコードする *SLC46A3* が同定されていたが、その分子機能は不明であった。本背景のもと、申請者は、SLC46A3 が葉酸トランスポーター SLC46A1 と高い相同性を有することに着目し、SLC46A3 のトランスポーターとしての機能および Lys-SMCC-DM1 の細胞内動態における役割について検討し、以下の新たな知見を 3 章にまとめている。

第 1 章では、リソソーム局在に関わるアミノ酸配列を欠損した SLC46A3 変異体 (SLC46A3 dC) を作成し、その変異体が細胞膜に発現する細胞系を用いて各種化合物の輸送機能評価を行い、SLC46A3 が細胞内外の H⁺濃度勾配を利用してステロイド抱合体および胆汁酸を輸送するトランスポーターであることを明らかにしている。本知見に加え、SLC46A3 はリソソーム内と同等の pH 領域で最大の輸送活性を示すことから、SLC46A3 の生理的役割はエンドサイトーシス経路を介して取り込まれたステロイド抱合体のリソソームから細胞質への排出に関わっていると考察されている。

第 2 章では、Lys-SMCC-DM1 のリソソームから細胞質への移行における SLC46A3 の役割を探るため、SLC46A3 dC 発現系における Lys-SMCC-DM1 の取り込みおよび HER2 陽性乳がん細胞株 (SK-BR-3、HCC1954 および KPL-4) に対する T-DM1 の殺細胞効果に及ぼす SLC46A3 阻害剤の影響について検討し、SLC46A3 が Lys-SMCC-DM1 を H⁺ 依存的に輸送することを明らかにし、T-DM1 の殺細胞効果が SLC46A3 の輸送活性を阻害するリソソーム蓄積性薬物 (clarithromycin、erythromycin および rifabutin) 存在下において著しく減弱することを見出している。以上の結果より、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 の薬効を制御していると述べられている。

第 3 章では、SLC46A3 の迅速かつ簡便な機能評価法を確立するため、SLC46A3 の基質となる蛍光プローブの探索を行い、5-carboxyfluorescein (5-CF) を同定している。SLC46A3 を介した 5-CF 輸送は SLC46A3 の基質である estrone 3-sulfate (E1S) により競合的に阻害され、既知の SLC46A3 基質/阻害剤による 5-CF 輸送ならびに E1S 輸送に対する阻害率は良好に相関することが示されている。さらに、本評価系を用いて、

ADC の payload に利用される抗がん剤が SLC46A3 の輸送活性に及ぼす影響を評価し、pyrrolobenzodiazepine dimer である SG3199 が SLC46A3 と有意に相互作用することを示すとともに、SLC46A3 dC 発現系を用いた取り込み試験により SG3199 が SLC46A3 の基質となることを見出している。以上の結果より、5-CF を用いた本評価系は SLC46A3 の迅速かつ簡便な機能評価や基質/阻害剤のスクリーニング、および T-DM1-薬物相互作用の予測に有用であると述べられている。

以上の研究成果は、T-DM1 の細胞内動態および薬効発現の分子機構を明らかにするとともに、T-DM1 治療の最適化や ADC の効率的な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。