

●Caco-2 細胞を用いた P-gp および BCRP トランスポーター試験

TN534

In Vitro Assays for the Evaluation of Modulators of P-gp and BCRP Using Caco-2 Cells

[概 要]

ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞は、P-gp (P-glycoprotein) や BCRP (breast cancer resistance protein) などのヒト由来の複数のトランスポーター (膜輸送体) を発現しており、均一に単層で増殖し、化合物の細胞間の通過を防ぐ細胞同士の密着結合であるタイトジャンクションを形成するため、消化管を模倣した吸収評価に適した細胞です。

当社の Caco-2 細胞を用いたトランスポーター試験は、開発化合物の P-gp および BCRP トランスポーターの基質性、ならびに P-gp トランスポーターの阻害能の評価によって、消化管吸収、腎排泄、胆汁排泄、脳移行性等の体内動態の理解や薬物相互作用のリスクアセスメントに有用な情報を提供します。基質性の確認では、排出トランスポーターである P-gp および BCRP の基質として開発化合物が認識されるかを (事例 1)、阻害能の確認では、P-gp のプローブ基質 (典型基質) であるジゴキシシン¹⁾ の輸送を開発化合物が阻害するか (事例 2) を双方向性輸送試験によって評価します。

なお、当社は Caco-2 細胞を用いた輸送試験として、開発化合物の腸管吸収を予測する受託サービス²⁾も提供しております。

Keywords: P-糖タンパク質 (MDR1)、乳がん耐性タンパク質、ABC トランスポーター、DDI

[背 景]

トランスポーターは、チャネルやレセプターと共に細胞膜上に存在する膜タンパク質で、生体内の伝達物質や薬物、代謝物、イオンなど多くの内因性物質の選択的輸送を司っています。ヒトにおいては種々トランスポーターが存在し、例えば P-gp (消化管吸収 (排泄)、中枢移行、胆汁・尿中排泄)、OATP1B1 (肝取り込み)、MRP2 (胆汁排泄)、OAT1・OAT3 (腎取り込み)、OCT1 (肝取り込み)、BCRP (消化管吸収 (排泄)、胆汁排泄、中枢移行)、MATE1、2 (尿排泄、胆汁排泄) などが生体内の薬物や内因性化合物等の吸収、分布および排泄に関与しています。

P-gp および BCRP は腎臓、肝臓、小腸、血液脳関門等に高発現している排出トランスポーターで、生体にとっての異物を細胞外へ汲み出すことによって生体防御を担っています。一方で、P-gp および BCRP は投与された薬物も基質として認識し輸送 (排出) することから、消化管吸収、腎排泄、胆汁排泄、脳移行性の影響を考慮した薬物の標的臓器への暴露に重要な役割を果たしていると考えられています。そのため、開発化合物の体内動態を考察する上で、開発化合物が P-gp および BCRP の基質として認識されるか (基質性) を評価することは非常に重要です。また、開発化合物と併用される可能性の高い薬剤が P-gp および BCRP の基質であるとき、開発化合物が P-gp および BCRP の輸送能を阻害するか (阻害能) を評価することも重要です。開発化合物が阻害能を有すると、併用する薬剤の排出が阻害され、血中もしくは組織中濃度が増加し、重篤な副作用を示す可能性があります。輸送および薬物相互作用のリスクアセスメントとして、開発化合物について P-gp および BCRP の基質性あるいはプローブ基質の輸送に対する阻害能を *in vitro* 試験で評価することがガイドライン¹⁾で推奨されています。

[手 法]

被験化合物を Caco-2 細胞の頂端膜側 (apical side) または基底膜側 (basolateral side) に添加し、一定時間後に細胞を透過した化合物の濃度を測定し、双方向 (apical side から basolateral side (A to B) または basolateral side から apical side (B to A)) の見かけの膜透過係数 (P_{app}) を算出します

(Fig. 1)。また、双方向の P_{app} の比から Efflux Ratio (ER) を算出します。 P_{app} は化合物の透過性を示すパラメータで、ER は輸送の方向性を示すパラメータとなります。

$$P_{app} = \left(\frac{dC}{dt} \right) \times \left(\frac{1}{A} \right) \times \left(\frac{V_R}{C_0} \right) \times 10^6$$

P_{app} : 見かけの透過係数 (10^{-6} cm/s)

dC/dt : 化合物の濃度変化 (nmol/L/s)

A : 膜面積 (cm^2)

V_R : レシーバー側溶液量 (mL)

C_0 : 初期濃度 (nmol/L)

$$\text{Efflux Ratio (ER)} = \frac{P_{app \text{ B to A}}}{P_{app \text{ A to B}}}$$

$P_{app \text{ B to A}}$: B to A の見かけの透過係数 (10^{-6} cm/s)

$P_{app \text{ A to B}}$: A to B の見かけの透過係数 (10^{-6} cm/s)

(基質性評価)

被験化合物が P-gp または BCRP の基質であるとき、基底膜側 (basolateral side) から頂端膜側 (apical side) への方向性輸送が認められ、既知のトランスポーター阻害剤 (P-gp : ベラパミル, BCRP : ko-143) の共存下においては被験化合物の方向性輸送は阻害されます。ER が 2 倍以上となり被験化合物の顕著な方向性輸送が認められ、かつ被験化合物の ER が既知のトランスポーター阻害剤の共存下で 50% を超えて阻害される場合、被験化合物は検討したトランスポーターの基質とみなすことができます。

(阻害能評価)

被験化合物非共存下の P-gp のプローブ基質であるジゴキシンの ER と被験化合物共存下のジゴキシンの ER を求め、被験化合物の P-gp に対する阻害能を評価します。被験化合物非共存下のジゴキシンの ER (control) を 100% とした時、被験化合物共存下におけるジゴキシンの ER が何% であるかを求め、その値 (% of control) が顕著に低かった場合は、被験化合物は P-gp に対する阻害能を有するとみなすことができます。

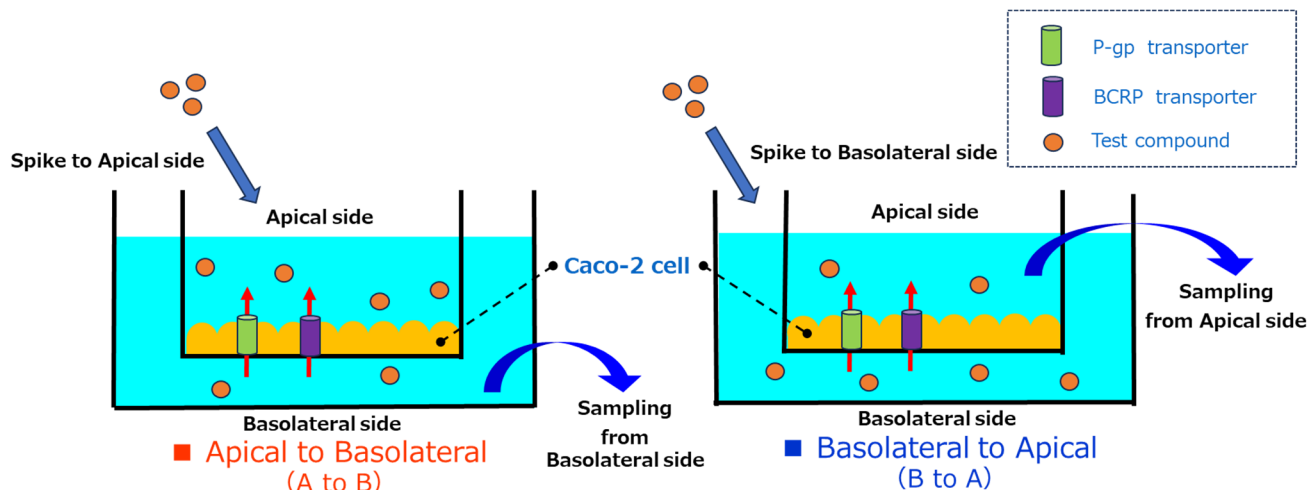


Fig. 1 Bi-directional transport assays with Caco-2 cells

[事 例]

1. 基質性の確認

Caco-2 細胞を用いて、ジゴキシンおよびキニジン（P-gp のプローブ基質）、エストロン-3-硫酸（BCRP のプローブ基質）、プラゾシン（P-gp および BCRP 両者のプローブ基質）、ならびにプロプラノロール（陰性対照）の、P-gp および BCRP の基質性をそれぞれ評価しました。その結果、陰性対照であるプロプラノロールを除いて、いずれも ER は 2 倍以上を示し、顕著な方向性輸送が認められました。さらに各プローブ基質に対応した既知のトランスポーター阻害剤（P-gp : ベラパミル, BCRP : ko-143）を添加した条件では ER が 50%以上低下し、P-gp または BCRP の基質と判定されました（Fig. 2）。これらのプローブ基質の検証結果から、本試験系が P-gp および BCRP 基質性を評価可能であることが示されました。

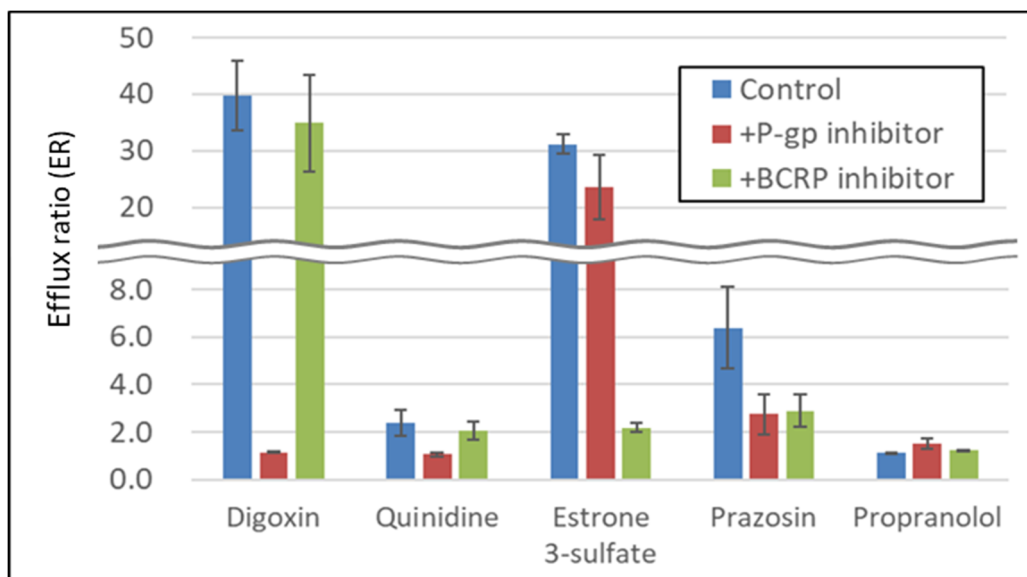


Fig. 2 Efflux ratio of test compounds without and with P-gp or BCRP inhibitor (n=3, mean $\pm$ SD)

2. 阻害能の確認

Caco-2 細胞を用いて、ジゴキシン¹⁾（P-gp のプローブ基質）の輸送に対するベラパミル¹⁾（P-gp のプローブ阻害剤）の影響を評価しました。その結果、ベラパミルは濃度依存的にジゴキシンの輸送を阻害し、プローブ基質の輸送を 50%阻害するときの阻害剤濃度を示す IC₅₀ 値は文献値²⁾と同等であることが示されました（Fig.3、Table 1）。プローブ基質の検証結果から、本試験系が P-gp 阻害能を評価可能であることが分かりました。

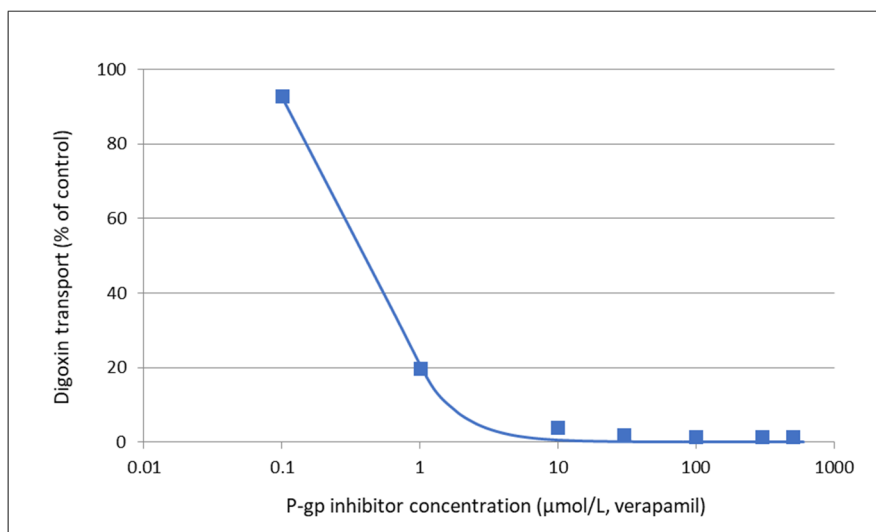


Fig. 3 Inhibition of digoxin transport across Caco-2 cells by P-gp inhibitor, verapamil (n=3, mean)

Table 1 Comparison of IC₅₀ values of P-gp inhibition by verapamil between SCAS and literature data

IC ₅₀ (μmol/L)	
SCAS data Estimated using Caco-2 cells	Literature data ²⁾ Estimated using human MDR1 expressed LLC-PK1 cells
0.44	0.57

このように、Caco-2 細胞を用いたトランスポーター試験は、体内動態の理解および薬物相互作用のリスクアセスメントに有用な情報を提供し、開発候補化合物の選択に貢献いたします。

[文 献]

- 1) ICH, 21 May 2024, “Drug Interaction Studies M12”, <<https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines#12>>, (accessed 2025-3-7).
- 2) Hiroshi Sugimoto, Shin-ichi Matsumoto, Miho Tachibana, Shin-ichi Niwa, Hideki Hirabayashi, Nobuyuki Amano, Toshiya Moriwaki : *J Pharm Sci.*, **100** (9), 4013 (2011).

[関連技術リンク]

- a) Caco-2 細胞膜透過性評価 <https://www.scas.co.jp/en/technical-informations/technical-news/pdf/tn382.pdf>