

MDR1-MDCK II 細胞を用いた P-gp 親和性・阻害能評価

TN393

P-glycoprotein Substrate and Inhibition Assay Using MDR1-MDCK II Cells

[概要]

MDR1 (Multidrug Resistance Protein 1) は P-糖タンパク質 (P-glycoprotein、以下 P-gp) と呼ばれ、ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターファミリーの 1 つです。主に脂溶性薬物を細胞内から細胞外へ排出するトランスポーターで、小腸、脳、肝臓など様々な臓器に多く発現しており、特に癌細胞においては抗癌剤の多剤耐性の原因の 1 つと考えられています。

薬物が P-gp の基質となるか、あるいは阻害作用を示すかは薬物間相互作用の観点から FDA ドラフトガイダンスでも重要視されている項目の 1 つです。当社では、イヌ腎臓由来 MDCK II (Madin-Darby Canine Kidney Type II) 細胞に P-gp を過剰発現させた MDR1-MDCK II 安定発現細胞を用いて、試験化合物が P-gp の基質であるかを評価する試験系、ならびに P-gp の典型基質に対して、試験化合物が P-gp 透過の阻害作用を示すかを評価する試験系の受託サービスを行っております。

[検証・実施例]

1. 親和性評価試験

MDR1-MDCK II 細胞および MDCK II 細胞を用いて、FDA ドラフトガイダンス^{1,2)}で P-gp の基質と明記されている 3 種の化合物 (ビンブラスチン、ジゴキシシン、キニジン) と P-gp の基質でない 2 種の化合物 (ベラパミル、プロプラノロール) の薬物輸送能 (P-gp 親和性) を評価しました。化合物を Apical 側または Basolateral 側に添加し、2 時間インキュベーション後の化合物濃度を測定し、見かけの膜透過係数 (P_{app})、各細胞の Ratio ならびに Net Flux Ratio を算出しました。また、試験結果の妥当性を評価するため、試験開始前に細胞膜抵抗 (TEER) の測定 (単層膜形成の確認)、試験終了後に Lucifer Yellow の透過を測定し (タイトジャンクションの確認)、単層膜の健全性を確認しました。

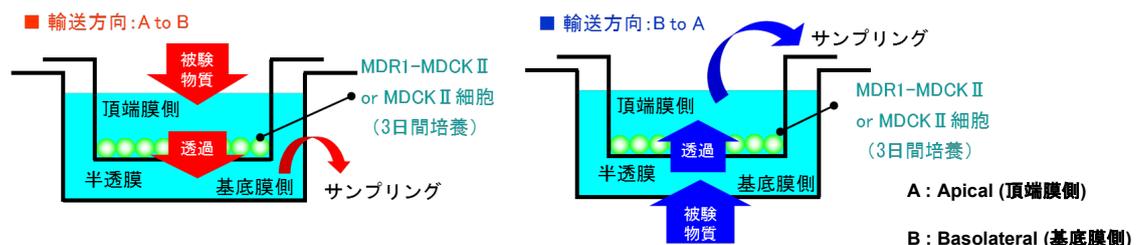


図 1 親和性評価の概略

以下に MDR1-MDCK II 細胞および MDCK II 細胞における Ratio と Net Flux Ratio を示します。当社の結果は、FDA 評価指標と合致しており、信頼性の高い評価系であることが検証されました。

表 1 親和性評価試験結果

化合物名	Ratio (MDR1-MDCKII 細胞)	Ratio (MDCKII 細胞)	Net Flux Ratio	FDA 指標
ビンブラスチン	10.0	2.0	5.0	3-9
ジゴキシシン	29.8	5.0	6.0	4
キニジン	5.3	0.9	6.0	5
ベラパミル	0.9	0.8	1.2	-
プロプラノロール	0.9	0.9	1.0	-

Ratio : $P_{app\ B-A} / P_{app\ A-B}$ 、 Net Flux Ratio : $Ratio_{MDR1-MDCK II} / Ratio_{MDCK II}$

2. 阻害能評価試験

MDR1-MDCK II 細胞を用いて、P-gp の基質と阻害剤を併用した際の、薬物輸送能への影響を評価しました。FDA ドラフトガイダンスに基づき、P-gp の基質としてジゴキシンを、阻害剤として3種の化合物（ケトコナゾール、キニジン、ベラパミル）を用いて評価を実施いたしました。

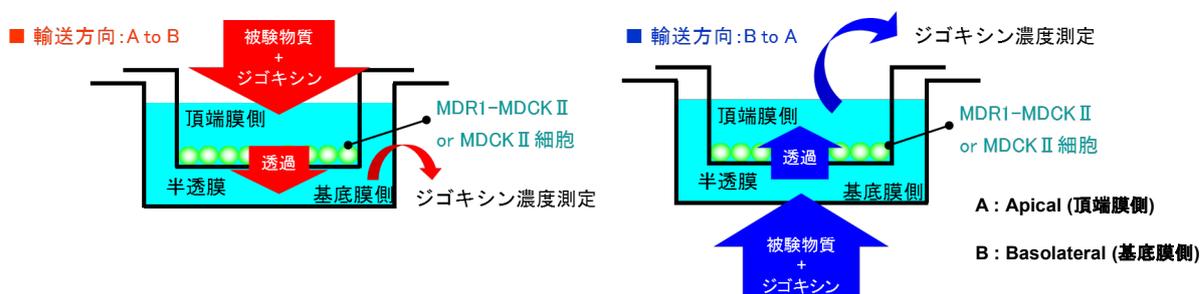


図2 阻害能評価試験の概略

その結果、下記のグラフの通り、阻害剤の添加によって P-gp によるジゴキシシン輸送の阻害が見られ、また算出された IC₅₀ 値は文献値と同等であることが確認されました。以上の結果から本試験系は、P-gp トランスポーターの阻害評価にも有効であると考えられます。

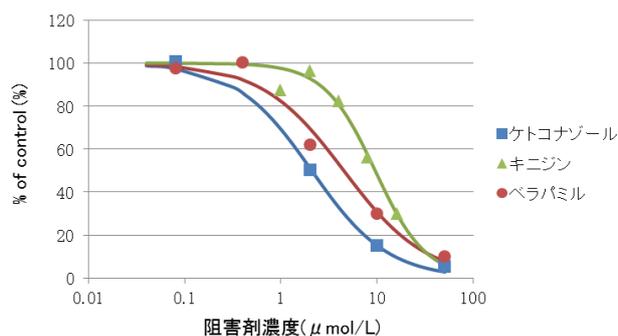


表2 P-gp 阻害剤の IC₅₀

化合物名	IC ₅₀	文献値 ³⁾
ケトコナゾール	2.1	1.2
キニジン	9.5	4.9
ベラパミル	4.1	2.8

図3 ジゴキシシン輸送に対する P-gp 阻害剤作用

[引用]

- 1) Guidance for Industry Drug Interaction Studies —Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) February 2012
- 2) Guidance for Industry Drug Interaction Studies —Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) September 2006
- 3) Calibration of in vitro multidrug resistance protein 1 substrate and inhibition assays as a basis to support the prediction of clinically relevant interactions in vivo. Drug Metab. Dispos. 2014, 42(9), 1411–22

[キーワード]

MDR、P-糖タンパク質 (P-gp)、ABC トランスポーター、MDCK II、薬物輸送能評価、膜透過性評価

[関連技術リンク]

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

Caco-2 細胞を用いた P-gp/BCRP トランスポーター評価

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn449.pdf>