

いまさら聞けない トランスポーターの基礎 - 入門編 -

第4回 Transcellular試験

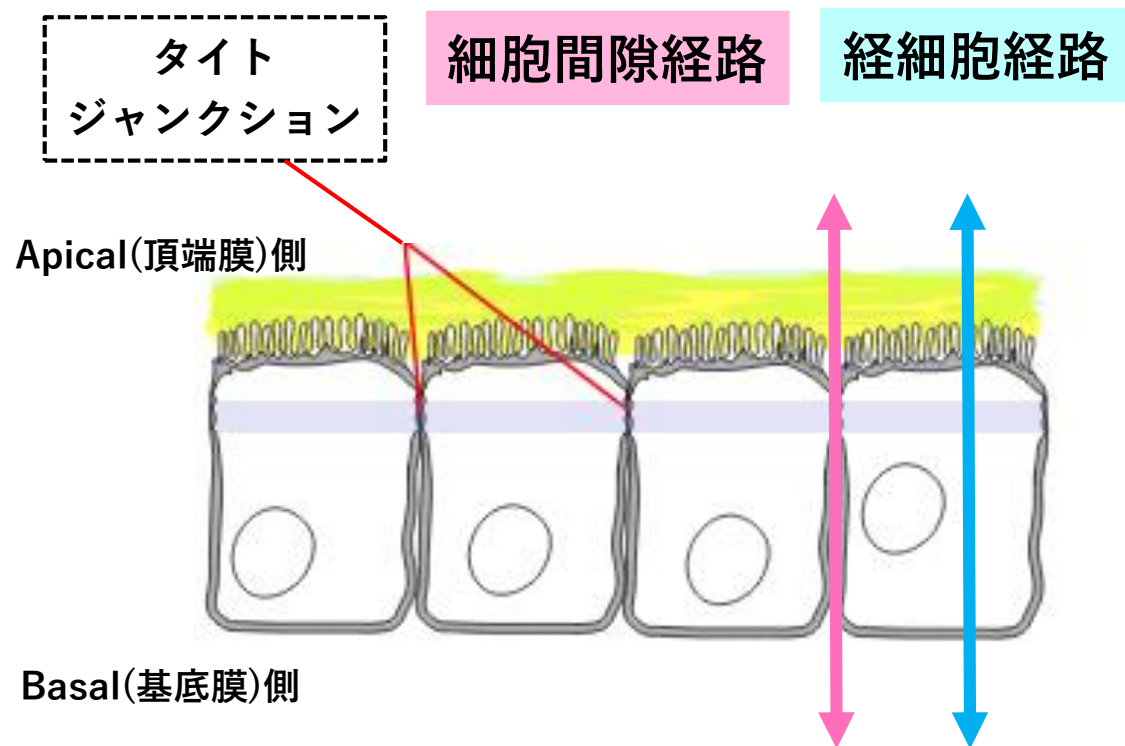
株式会社ジェノメンブレン

なぜTranscellular試験が必要か？

経細胞輸送試験は物質が細胞膜を通過して細胞内を移動し 反対側の膜から外へ出るか調べる試験

- 細胞の「中」を通過するルートに着目
- 薬物の吸収やその効率を測定
- 薬物が生体内でどのように移動するかを理解
- 薬物が細胞の膜を通過して移動する能力を評価
- 吸収・分布・代謝・排泄（ADME）の特性を総合的に評価

上皮細胞における物質の通過経路



【経細胞経路】 トランスセルラー経路

- 細胞の中を通過して内外の環境に移動する経路
- 細胞膜を通じて移動
- サイズが大きい物質、脂溶性が高い物質
例) グルコース・カフェイン

【細胞間隙経路】 パラセルラー経路

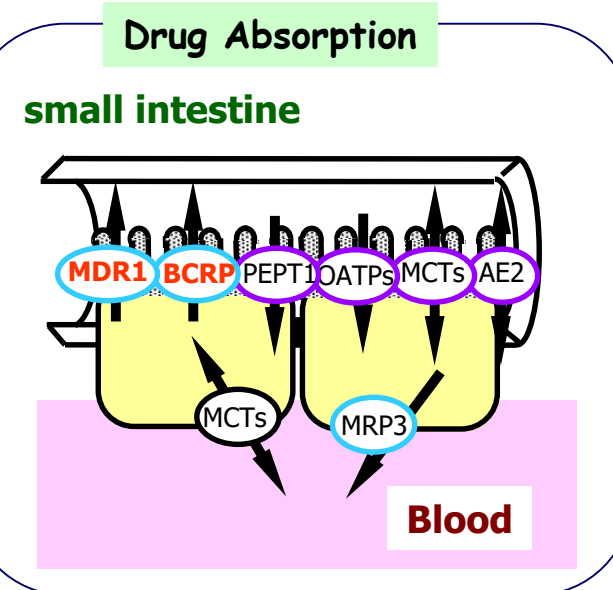
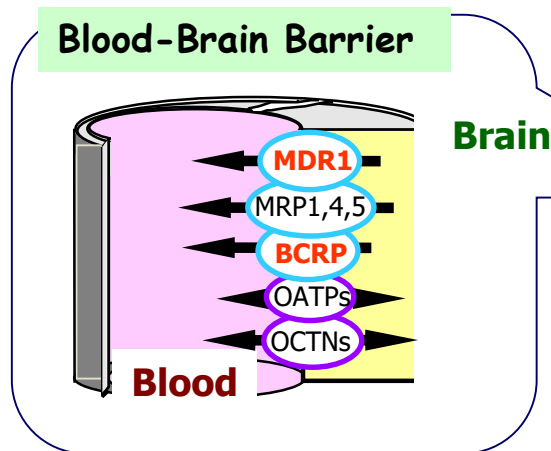
- 隣接する細胞間の隙間を通過して移動する経路
- 濃度勾配に従って細胞膜を介さず隙間を直接移動
- サイズが小さい物質、親水性の物質
例) 水・マンニトール・スクロース

【密着結合】 タイトジャンクション

- バリア機能の形成・極性の維持

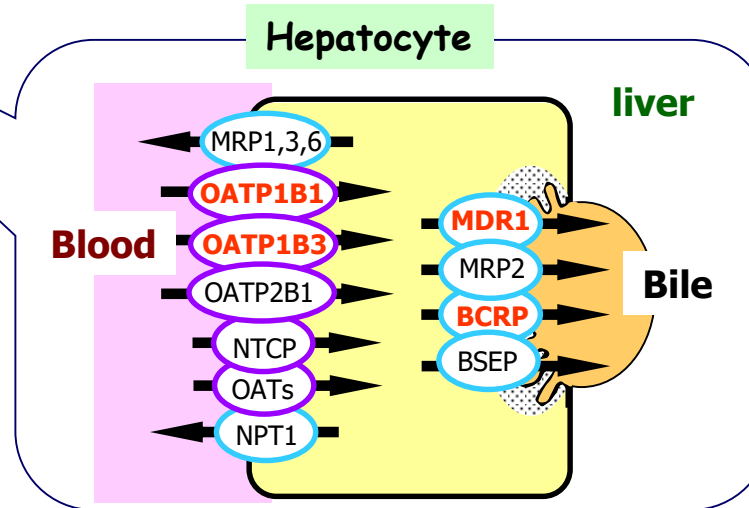
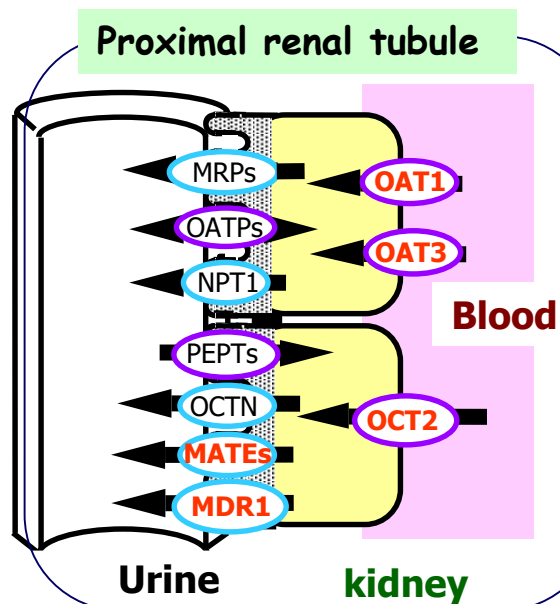
経細胞輸送とトランスポーターの組織分布

脳血液関門
を超える
輸送と排出



消化管での
吸収と排泄

腎臓での
電解質の
再吸収と
尿中排泄



肝臓での
胆汁中排泄

代表的な経細胞輸送実験モデル

目的は？
吸収？代謝？排泄？

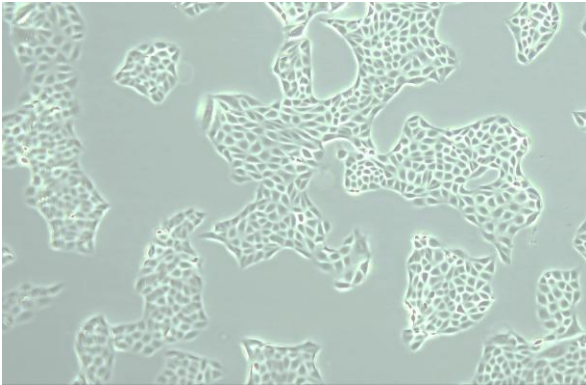
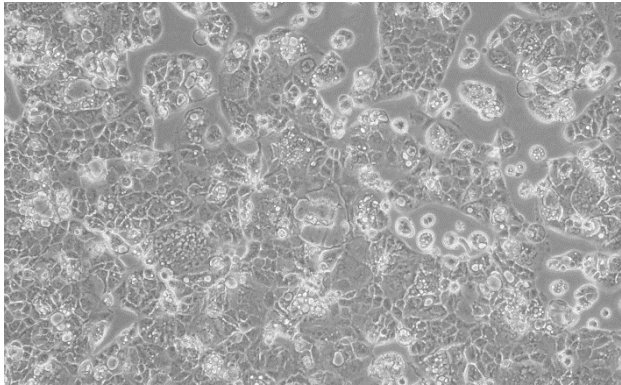
トランスポーターは？
酵素は？

ヒト由来？動物由来？

取り扱いやすい？

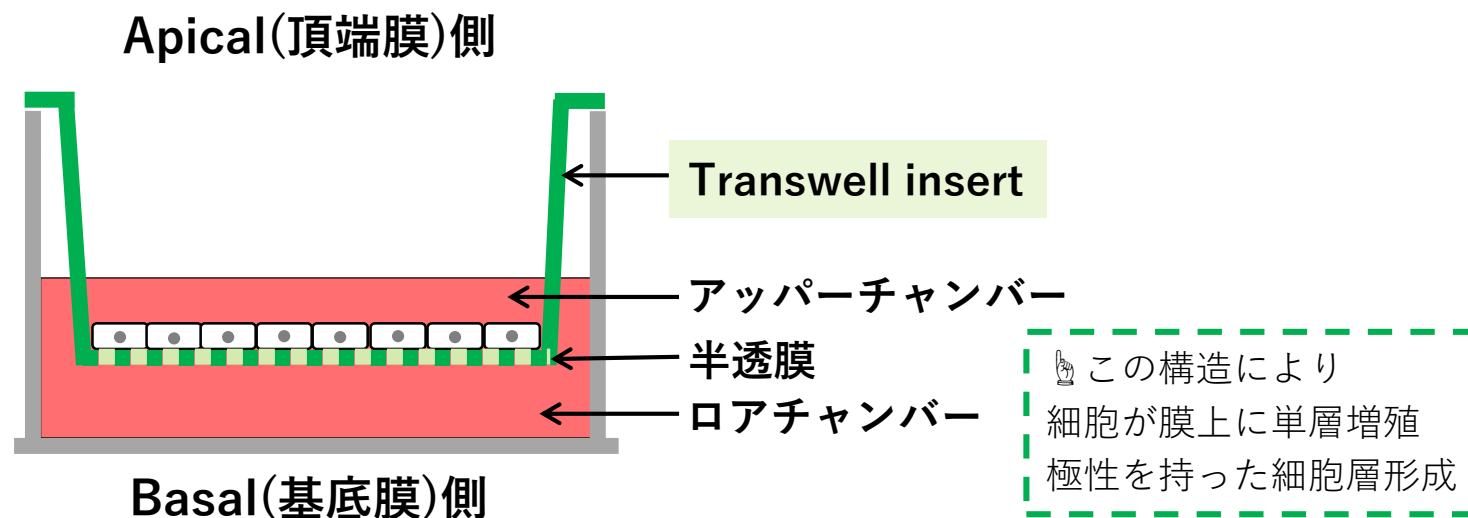
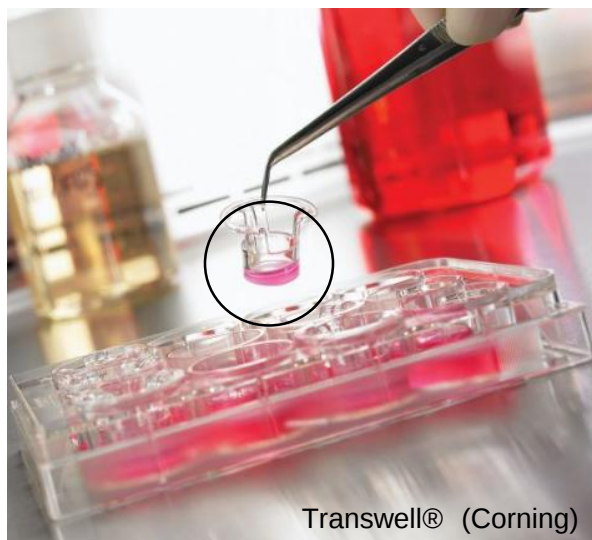
培養細胞モデル	由来	主な用途
Caco-2	ヒト大腸腺癌由来 腸管上皮	小腸上皮モデル 経口吸収予測
MDCK / MDCK II	イヌ腎臓上皮 集合管(I) 近位尿細管(II)	透過性評価・バリア性評価
HT29-MTX	ヒト大腸腺癌由来 (ムチン産生株)	粘液層の影響評価
F-hiSIEC	ヒトiPS細胞由来小腸上皮	ヒト小腸に近い吸収 代謝評価
hCMEC/D3	ヒト脳毛細血管内皮	血液脳関門 (BBB) モデル

MDCKII細胞 と Caco-2 細胞の違いと特徴

特徴	MDCKII細胞モデル	Caco-2細胞モデル
由来	イヌ腎臓上皮細胞株	ヒト結腸腺癌細胞株
主な用途	腎臓透過性評価・血液脳関門評価(代用)	経口薬の小腸吸収評価・透過性評価
タイトジャンクション形成	比較的早く形成 (約4日) 比較的強い	分化に時間がかかる (約21日) 緩い～やや強い (株により差がある)
トランスポーター発現	限定的 (MDR1発現株あり) 安定発現または一過性として発現	多くの腸管トランスポーターを自然発現
形態		

どんな「道具」を使うのか？

経細胞輸送試験でよく使われるトランスウェル (Transwell®) *という特殊な培養容器



部位	説明
アッパーチャンバー (Apical側)	細胞を播種する側。薬剤や試料を添加することが多い。
半透膜 (Microporous membrane)	上室と下室を隔てる膜。孔径は $0.4\mu\text{m}$ ～ $8\mu\text{m}$ など用途に応じて選択
ロアチャンバー (Basal側)	細胞の裏側にあたる。アッパーチャンバーから透過した物質を回収する側

* Transwell：Corning社製商品名、一般名：セルカルチャーインサート。各社 様々な商品名のものが販売されています

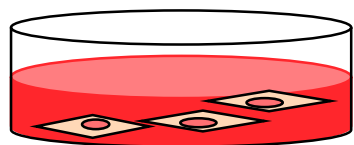
MDCKIIおよびCaco-2細胞の培養準備

[播種・継代維持]

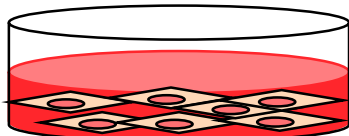
[継代]

[細胞数計測]

[Transwellの平衡化]

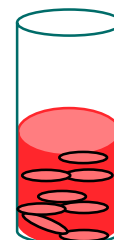


増殖

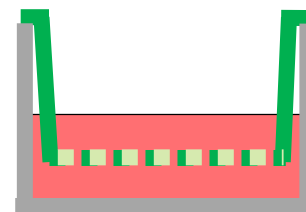


80%コンフルエント

トリプシン処理
により剥離



細胞塊があれば
再懸濁・再計測

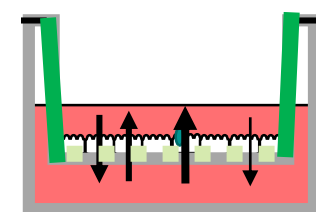


培地を入れ37°Cで1時間

Point!

- ✓ 継代維持は80%コンフルエントまでに
- ✓ トリプシン濃度は**0.25%**を使う
 - 細胞のカウント時に**シングルセルかどうか確認**
- ✓ 密集しないよう可能な限り均一に播種
 - 部分的な過剰コンフルエンスは分化に影響**
- ✓ 継代回数過多は機能低下するため30継代まで
- ✓ メーカー指定の規定液量を遵守
 - 内外の液面の高さが均一になるように**

Apical(頂端膜)側



Basal(基底膜)側

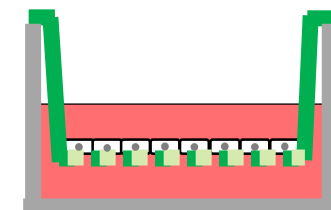
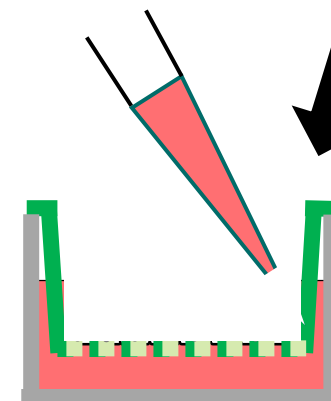
トランスポーター
など発現
[細胞分化]

均一に懸濁
インサート内に
規定濃度の細胞を播種

MDCKII : 4日間培養
Caco-2 : 21日間培養

タイトジャンクション形成
分化

インサート内の
培地を
アスピレート

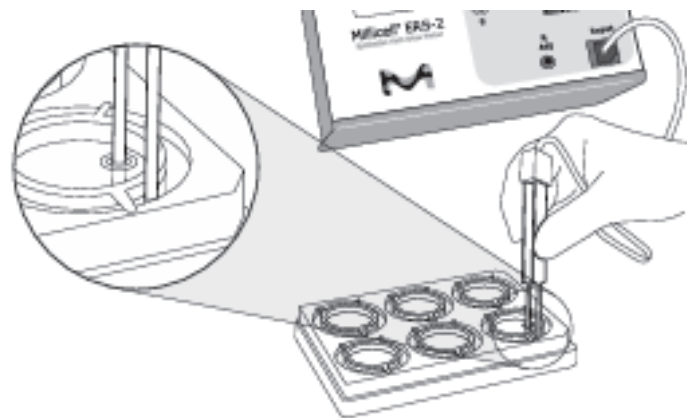


[播種・培養]

37°C5%CO2
培養
2日に一度
培地交換

単層膜の健全性評価方法①

タイトジャンクション形成の確認：膜透過試験実施前に経上皮電気抵抗(TEER) 値を測定して評価



MerkMillipore, Millicell ERS-2(MERS00002)
User Guide

抵抗値測定機（オームメーター）
インサートの内側と外側に
電極を置いて抵抗値を測定
培地のみのwellをBlankとする

$$\text{TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (\text{測定値} - \text{Blank}) \times \text{インサートの面積}$$

細胞株の種類	模倣する生体バリア	TEER値の目安
Caco-2	小腸上皮	200～1,000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$
MDCKII	腎臓尿細管上皮	150～500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$
iPSC由来BBB	血液脳関門（BBB）	500-1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$
LLC-PK1	腎臓尿細管上皮	1,000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上

Point!

- ✓ 定前に室温で30分程度平衡化しておく。
- ✓ 測定するときの条件(培地組成、液量、温度など)を一定にする
- ✓ 使用細胞株がどの程度のバリア機能を持っているか理解しておく

単層膜の健全性評価方法②

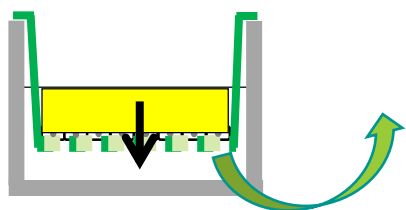
タイトジャンクションの形成維持の確認：パラセルラーマーカを使用した評価

【Lucifer Yellowを使用した方法】

被験化合物の膜透過試験終了後

Apical側を全てのwellを一定濃度のLFYに交換

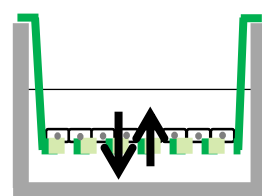
60分程度膜透過しBasal側のLFY濃度を測定する



蛍光測定
透過率算出

【 ^{14}C -Mannitolを使用した方法】

^3H 標識した基質を用いる場合、パラセルラーマーカとして一定濃度の ^{14}C -Mannitolを薬液に添加し回収サンプルの ^{14}C dpmも測定する



評価化合物溶液に一定量添加
 ^{14}C のdpm測定
透過率算出

👉 Point!

Papp値（透過係数）カットオフ目安 （LFYを使用したMDCKII細胞の場合）

$>3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ データは不採用

$>5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ではタイトジャンクションの破綻が疑われる

経細胞輸送試験の内部標準の例

評価物質の透過性に影響しない範囲の濃度で、膜透過性の内部標準を用いて系の妥当性確認できるだけトランスポーター基質でない物質を選定し、双方向透過性の比較として使用

グループ	化合物名
高膜透過性 (fa $\geq$ 85%)	Propranolol 、 Metoprolol 、Caffeine、Antipyrine
中等度膜透過性 (fa =50-84%)	Atenolol 、Metformin、Chlorpheniramine
低膜透過性 (fa < 50%)	Famotidine、Nadolol
非膜透過性	Lucifer yellow、Inulin、FITC-Dextran

参照/PMDA：ICH-M9 BCS バイオウエーバー

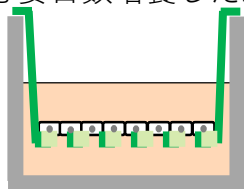


細胞に負荷を掛けず、かつ分析可能な初期濃度を設定 (5~10uM程度)

Caco-2細胞を用いた吸収評価試験手順

[単層培養]

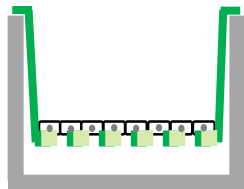
Transwell上で分化に必要な日数培養した細胞



培地を
アスピレート

[洗浄]

37°Cに温めたアッセイ
バッファーを添加



洗浄x3

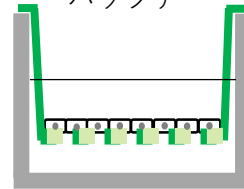
バッファーを
アスピレート

[プレインキュベーション]

37°Cに温めた

プレインキュベーション

バッファー

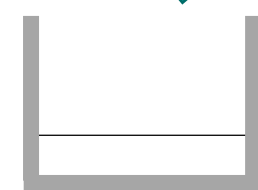


37°C, 5% CO₂, 30分
プレインキュベーション

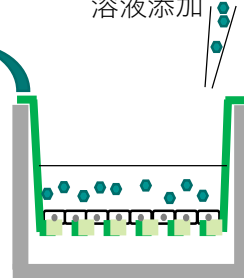
バッファーを
アスピレート

[評価物質添加： A to Bの場合]

別の新しいwellに
37°Cに温めた
評価物質(-)溶液を準備



評価物質(+)
溶液添加

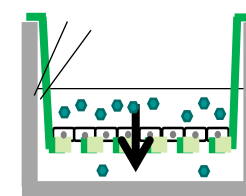


37°C, 5% CO₂
インキュベーション

Transwell Insertを
溶液をいれたwellに
セットして輸送開始



Insertの隙間に
Tipの先を入れ溶液採取



[採取]

任意の時点で**Basal側**から
溶液採取

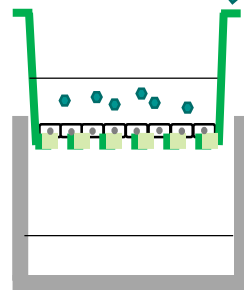
採取した液量を都度追加

最終採取時点

溶液追加
不要

[透過終了]

終了後の
溶液採取



洗浄x3

Insertを外して
輸送終了



Point!

- ✓ 評価物質(+)溶液の添加方向に注意する
- ✓ 終濃度DMSO含有量は<0.5%
- ✓ Tipの先で半透膜や細胞を触らないように
-特にアスピレート時に注意
- ✓ 上下チャンバーにいれる溶液量は厳守
- ✓ 溶液採取後、溶液追加を忘れない
- ✓ 細胞サンプルを採取する場合は最終時点後
冷却PBS(-)で素早く洗浄

Papp値 透過係数の算出

Papp値（見かけの透過係数, Apparent Permeability coefficient）:

薬物が細胞のバリアをどのくらいの速さで通過したかを示す指標

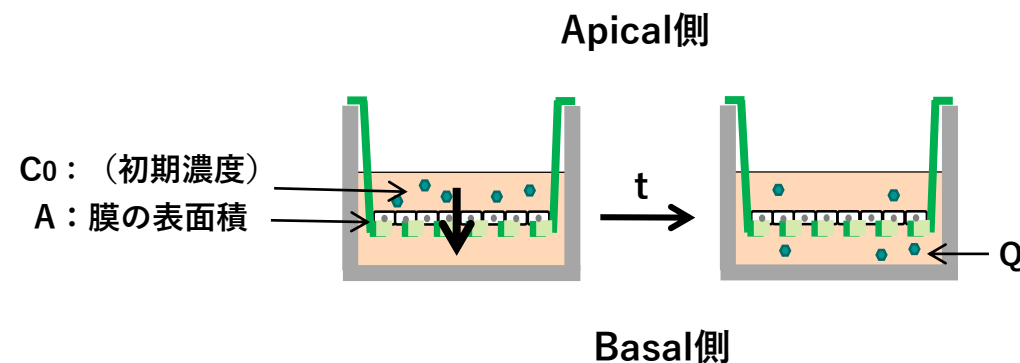
$$P_{app} = (dQ/dt)(A \times C_0)$$

dQ/dt (透過速度) : 単位時間あたりの透過量 (mol/s)

A : 膜の表面積 (cm^2)

C_0 (初期濃度) : 評価物質を最初に加えた側の初期濃度 (nmol/cm^3)

透過性分類の 目安	Papp値
高透過性	$P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$
中透過性	$P_{app} \approx 2-10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$
低透過性	$P_{app} < 2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$



Efflux Ratio（排出比：ER）の算出

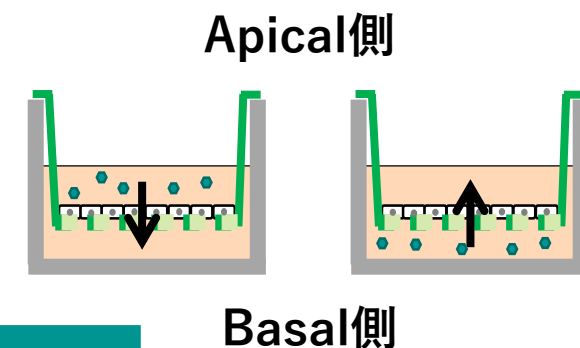
Efflux ratio（排出比）

Efflux ratioを計算するためには、評価化合物を**双方向で輸送させる実験が必要**

$P_{app}(A \text{ to } B)$ ：Apical側からBasal側への透過係数

$P_{app}(B \text{ to } A)$ ：Basal側からApical側への透過係数

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



Efflux Ratio値	解釈	考察
～1.0	対称的な透過性	トランスポーター非関与の可能性が高い
1.5～2.0	排出傾向あり	トランスポーターの関与が疑われる
2.0～5.0	明確な排出	P-gpやBCRPの基質である可能性あり
>5.	強い排出性	トランスポーター基質性が非常に高い

Point! トランスポーターの関与が疑われる場合、阻害剤併用試験を行い基質性を明確にする必要あり

阻害試験の解析

評価物質（阻害剤）非存在下でのP_{app}値（pmol/cm²）を100 %として、評価物質（阻害剤）存在下でのP_{app}値より% of Control を算出

$$\% \text{ of Control} = \frac{\text{評価物質(阻害剤) 存在下でのP}_{\text{app}}}{\text{評価物質 (阻害剤) 非存在下でのP}_{\text{app}}} \times 100$$

得られたグラフを最小二乗法の回帰式を用いて、50 %阻害率（IC₅₀）を算出する。
別途求めたK_m値から、以下の式で阻害定数（K_i）が求められる。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S] / K_m}$$

K_m:ミカエリス定数
[S]:基質濃度

トランスポーター基質と阻害薬の例

トランスポーター	基質	阻害薬
P-gp (MDR1)	Digoxin、N-methyl-quinidine (NMQ)、Quinidine、Vinblastine	GF120918、Verapamil、Valspodar (PSC833)
BCRP	Estrone-3-sulfate、Prazosin、Rosuvastatin	GF120918、Ko143、Novobiocin
OATP1B1, OATP1B3	Estradiol-17 β -glucuronide、Pitavastatin、Cholecystokinin octapeptide (CCK-8、: OATP1B3のみ)、Pravastatin	Bromosulfophthalein (BSP)、Rifampicin、Cyclosporine、Rifamycin SV
OAT1	Adefovir、Cidofovir、p-aminohippurate (PAH)、Tenofovir	Benzylpenicillin*、Probenecid
OAT3	Benzylpenicillin、Estrone-3-sulfate、Methotrexate	Benzylpenicillin*、Probenecid
MATE1, MATE2-K	Tetraethylammonium (TEA) Creatinine、Metformin	Cimetidine、Pyrimethamine、Quinidine
OCT2	OCT2 Creatinine、Metformin、Tetraethylammonium (TEA)	Cimetidine、Clonidine、Pyrimethamine、Verapamil

Transcellular試験～おわりに～

薬物の経口投与後の吸収効率を予測

薬物の最適化や安全性の向上

その特性を理解するために必要不可欠な情報を得る

- ✓ 試験に使用する細胞の健全性が結果を大きく左右
- ✓ 施設内のバリデーションで確立された統一条件で試験を行う
- ✓ 試験法や結果の一貫性を示すために、単層膜の健全性評価や膜透過内部標準物質の試験を並行して実施する



弊社取り扱い製品ご紹介

(Appendix)

● *CacoReady*TM細胞プレート

MedTech社CacoReadyプレートは、ヒト結腸直腸癌由来の細胞株であるCaco-2細胞をトランスウェルプレート上に播種後、21日間にわたって培養し分化させており、アッセイに使用できる状態で提供されます。

24well もしくは96wellフォーマットが選択可能。

※スペインのMedTech社から直送提供されます。

● *TransFlex*TM細胞プレート

BioIVT社のTransFlexシステムに基づいて、弊社にて取込もしくは排出型トランスポーター又はその両方をMDCKII細胞に一過性発現させた生細胞を96-well plateのみでご提供しております。

自由なレイアウトが可能で培地交換等が不要。

アッセイに使用できる状態で提供されます。



TransFlex plateの特徴 96well plateでありながら24well plate用のTranswell(0.33cm²)と同等の培養面積(0.27cm²)。24well plate x4枚分相当

TransFlex™細胞プレート関連情報 (Appendix)

TransFlex™シングルトランスポーター

【ヒト、ABC 順】

ASBT	EAAT2	GlyT1	OAT3	OCTN1	SNAT1
Asc-1	ENT1	MATE1*	OAT4	OCTN2	SNAT2
BCRP	ENT2	MATE2-K	OATP1A2	PCFT	ThTr1
CNT1	ENT4	MDR1	OATP1B1	PEPT1	ThTr2
CNT2	FRα	NET	OATP1B3	PEPT2	URAT1
CNT3	GAT1	NTCP	OCT1	SERT	xCT
DAT	GAT2	OAT1	OCT2	SGLT2	
EAAT1	GAT3	OAT2	OCT3	SMVT	

TransFlex™マルチトランスポーター

【一例 抜粋】

OATP1B1/NTCP/BSEP
NTCP/BSEP
OATP1A2/MDR1
OAT3/BCRP
OAT3/MRP2

BSEP, MRP2は
取込みトランスポーターとの
組み合わせで発現
他の組み合わせもあります

 FDA・EMA・HLMW推奨薬物トランスポーター

* MATE1 に関してはお問い合わせください。

詳しくは <https://www.genomembrane.com/transflex-jp>