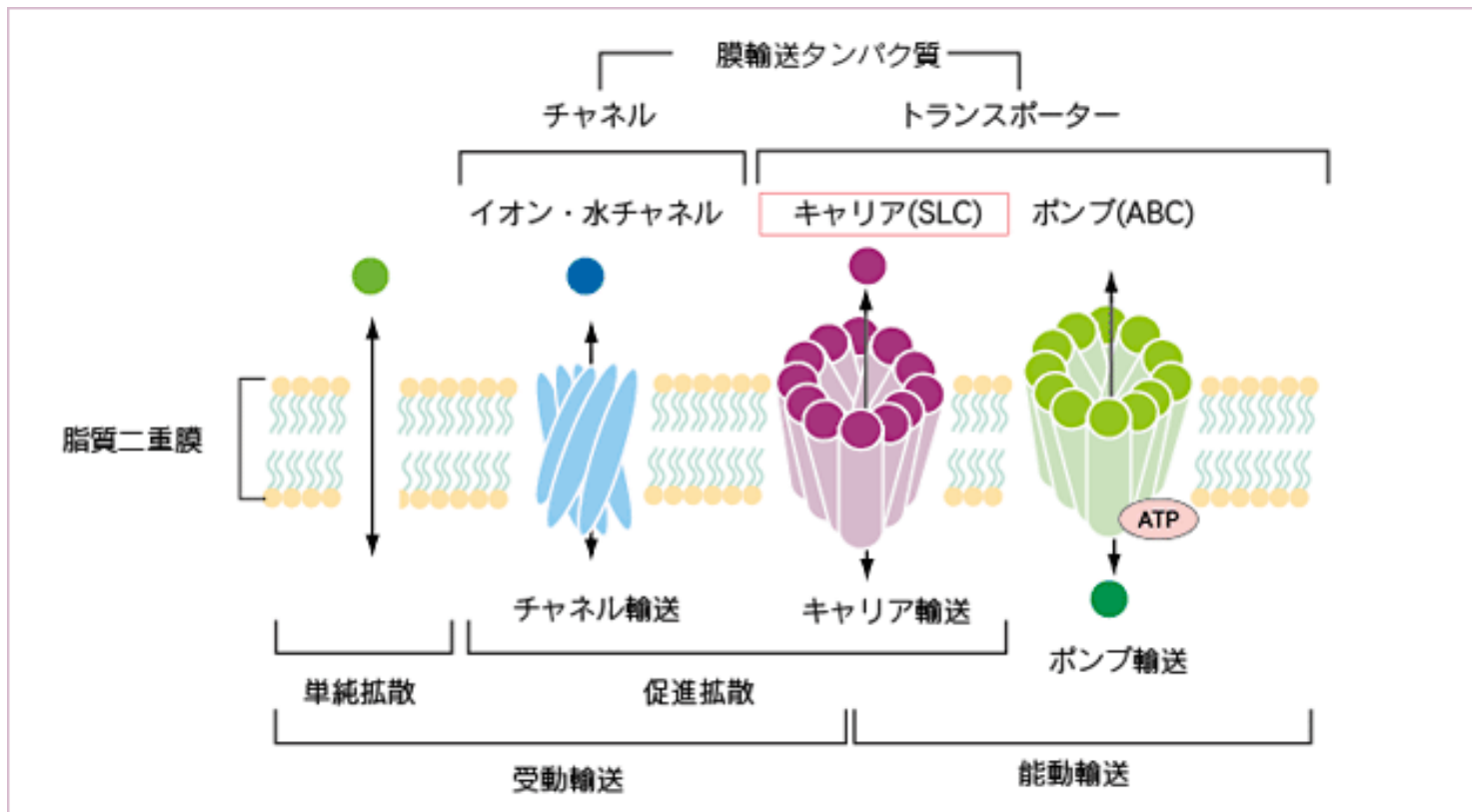


いまさら聞けない トランスポーターの基礎 － 入門編 －

第3回 SLCトランスポーター試験について

株式会社ジェノメンブレン

細胞膜を介した物質の輸送



<https://ruo.mbl.co.jp/bio/product/transmembrane/slc.html>

受動輸送vs 能動輸送

受動輸送: エネルギーを使わない輸送方法
(濃度勾配に従う)

能動輸送: エネルギーを使って行う輸送方法
(濃度勾配に逆らう)

単純拡散vs 促進拡散

単純拡散: 細胞膜をそのまま通り抜ける拡散

促進拡散: タンパク質の助けを借りる拡散

チャンネルvs トランスポーター

チャンネル: 「門」や「トンネル」。通り道が開くだけ
両側からアクセスできる

トランスポーター: 物質を1つずつ運ぶ「搬送役」
片側からしかアクセスできない

キャリア輸送vsポンプ輸送

キャリア輸送: エネルギーを使わない輸送方法

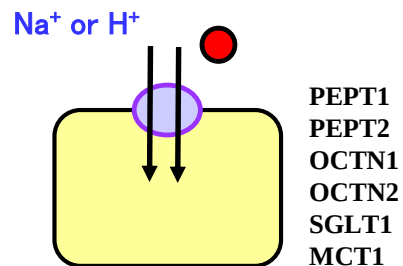
ポンプ輸送: エネルギーを使って逆向きに運ぶ輸送方法

SLCトランスポーターとは？

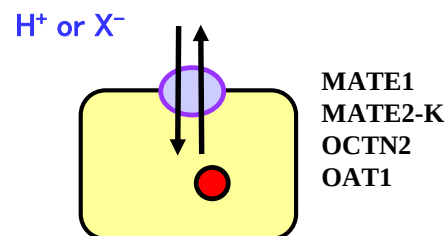
Solute carrier (SLC) transporter family:

- ◆ 溶質(イオンや小さい分子)を細胞の内外に運ぶタンパク質のファミリー
- ◆ エネルギー(ATP)を利用せずに促進拡散を行うキャリア
- ◆ 65～66ファミリー、450前後が存在すると言われている
(SLC Tables: <https://slc.bioparadigms.org/>)

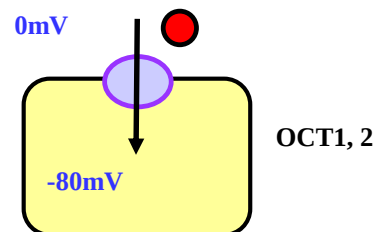
1. 共輸送 (Co-transporter)



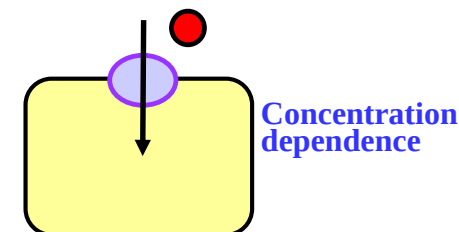
2. 交換輸送 (Exchanger)



3. 膜電位 (Membrane Potential)

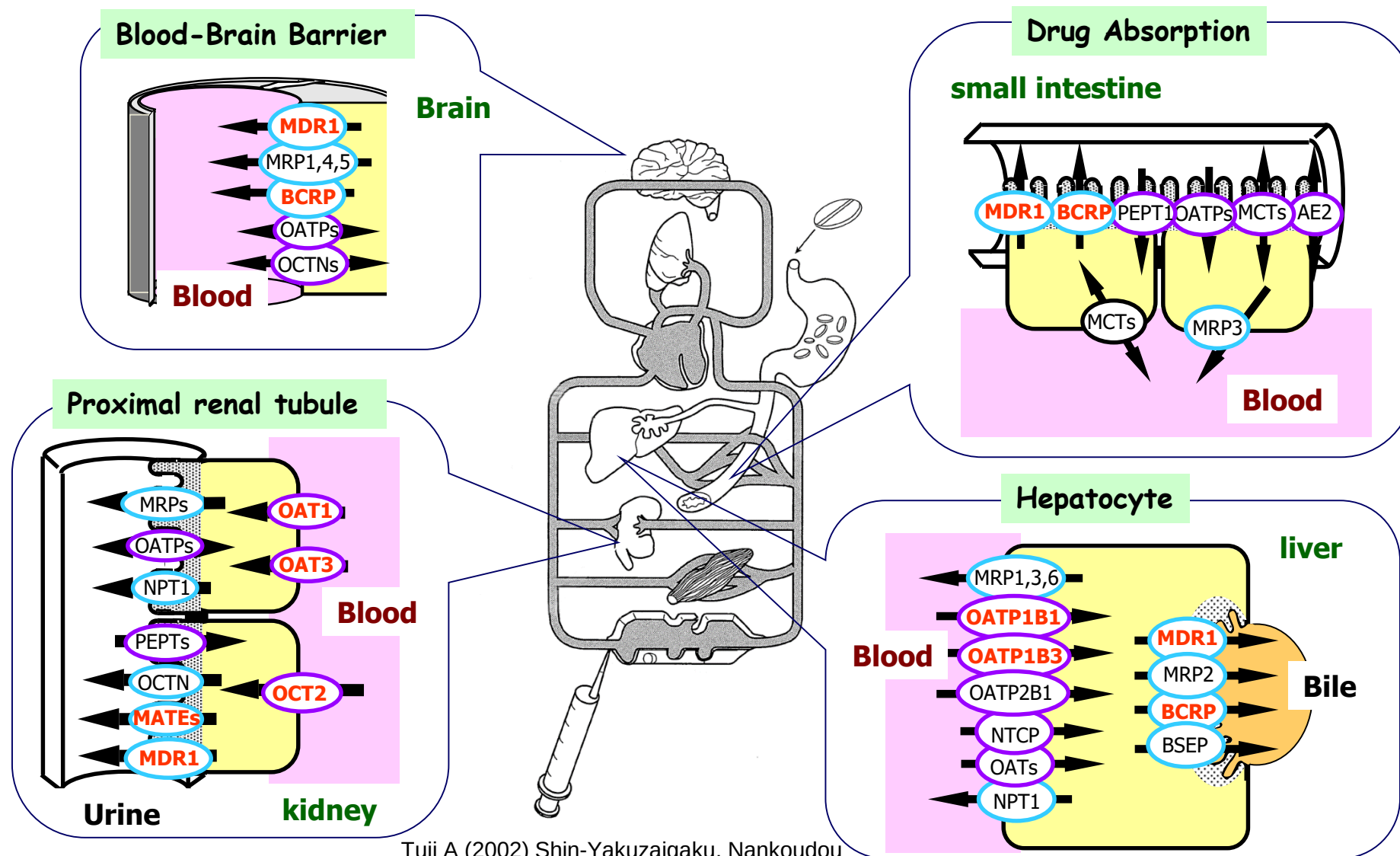


4. 促進拡散 (Facilitated Diffusion)



Mechanism Unknown; OATP family etc

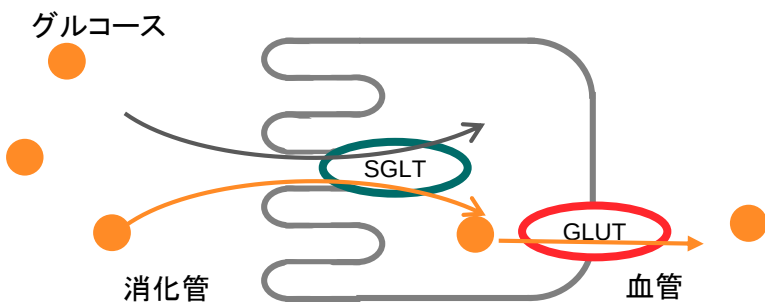
SLCトランスポーターの役割-薬物動態において



SLCトランスポーターの役割-その他

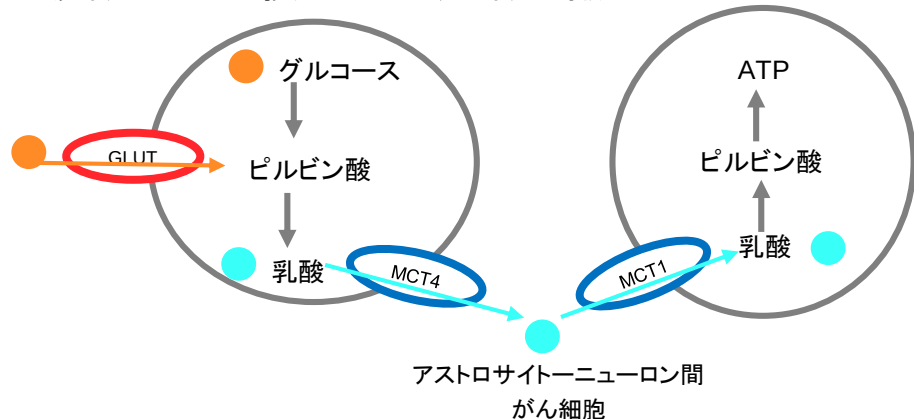
栄養物質輸送:

グルコース(GLUT)、アミノ酸(SLC7, SLC1, SLC38等)など



イオン・代謝産物の移動:

炭酸イオン交換(SLC4)、乳酸運搬(SLC16)



疾患との関連

代謝系	SLC2	発達障害, Fanconi-Bickel症候群(FBS)
	SLC16	乳酸アシドーシス
神経系	SLC6	うつ病、てんかん、自閉症、ADHD
腎臓	SLC12	バーデター症候群
	SLC34	低リン血症性くる病
消化器	SLC5	ファンコーニ症候群
骨・発達	SLC13	骨粗鬆症
薬剤応答	SLC21	薬物性腎障害
	SLC22	薬剤排泄異常

SLCトランスポーターの機能評価

[A] 評価系

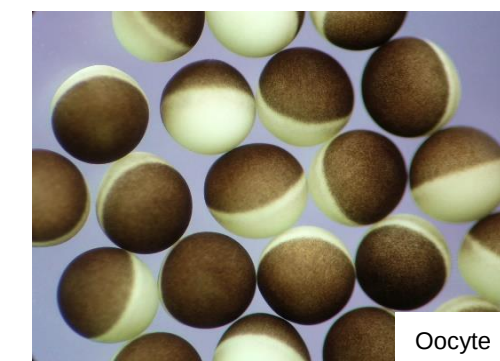
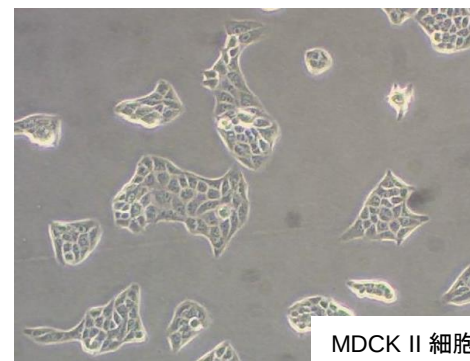
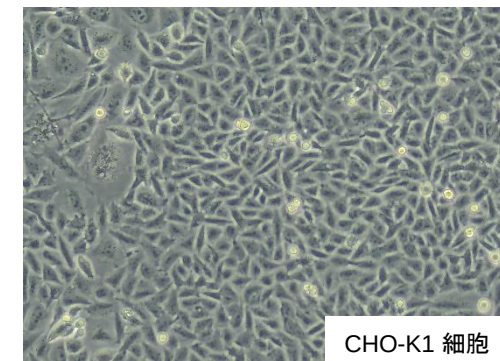
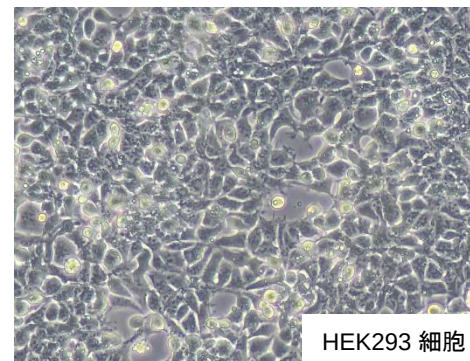
[1] 発現細胞

HEK293細胞: e.g. TRANSiPORT、細胞プレート

MDCK細胞: e.g. TransFlex

CHO細胞

Xenopus oocyte



[2] 肝細胞や肝細胞株

[B] 評価方法、アッセイ方法

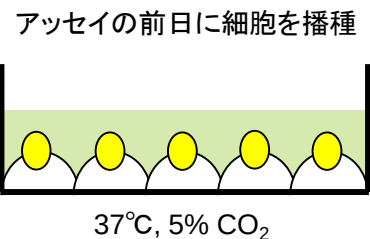
放射性標識基質を用いた取り込み試験

蛍光基質 (fluorescent substrate) を使った取り込み試験

LC-MS/MSによる非標識基質の定量

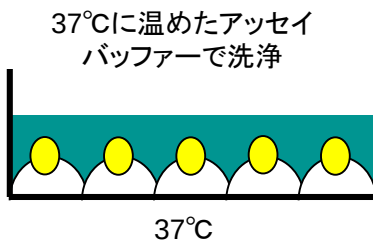
発現細胞を用いた機能評価 ①手順

[播種]



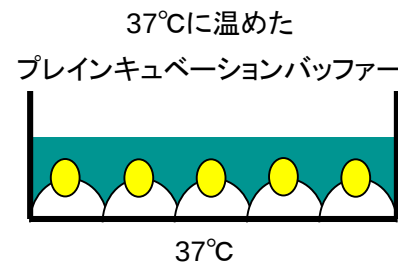
培地をアスピレート

[洗浄]



アッセイバッファーを
アスピレート

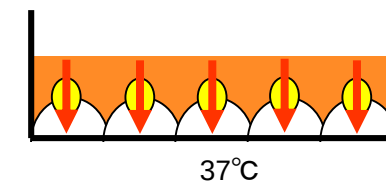
[プレインキューベーション]



プレインキューベーション
バッファーをアスピレート

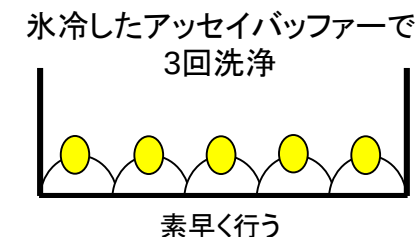
[取り込み]

化合物溶液を入れて反応開始



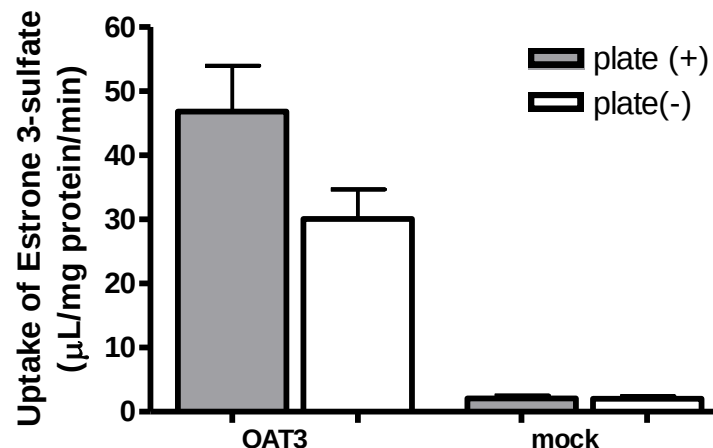
任意の時間になっ
たら化合物溶液を
素早く吸引

[洗浄 × 3]



Point!

- 接着が弱い細胞、例えばHEK293細胞を用いる時は poly-Lysineによるコートが必要
- バッファーを入れる時は細胞に直接当たらないように 壁に沿って入れる
- バッファーの温度が37°Cになるようにプレートの下に 金属プレートを入れるかホットプレートを少し高めに設 定しておくが良い
- ウォッシュバッファーを入れっぱなしにしない
- 有機溶媒は終濃度0.5%以下に抑える (最大でも1.0%)



発現細胞を用いた機能評価 ② コート剤

リシンコート: Corning #356414

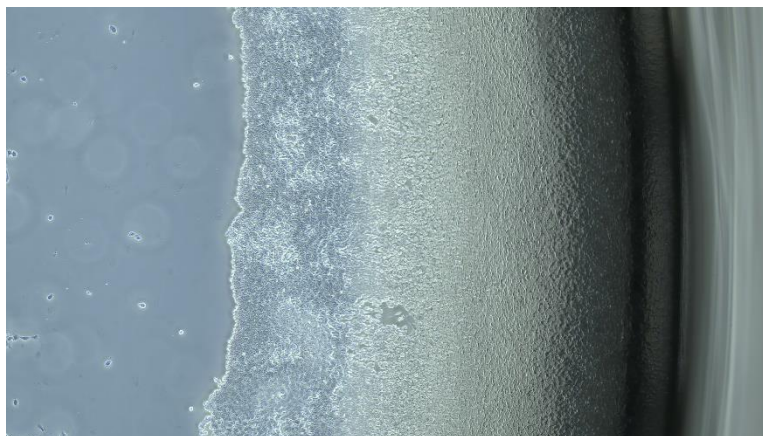
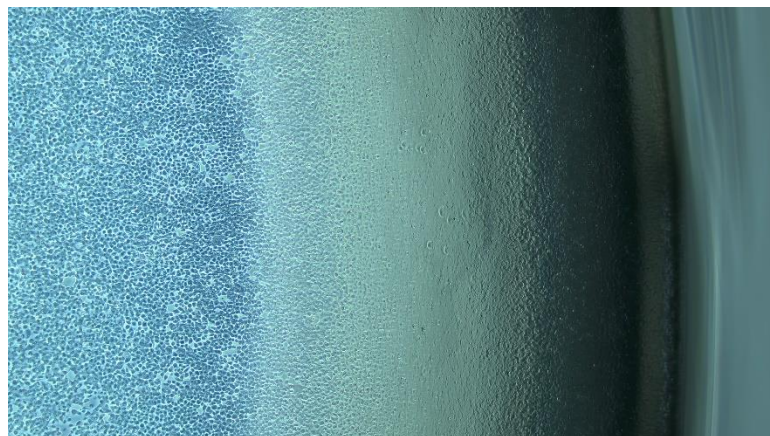
コラーゲンコート: Corning #356408

アッセイ前

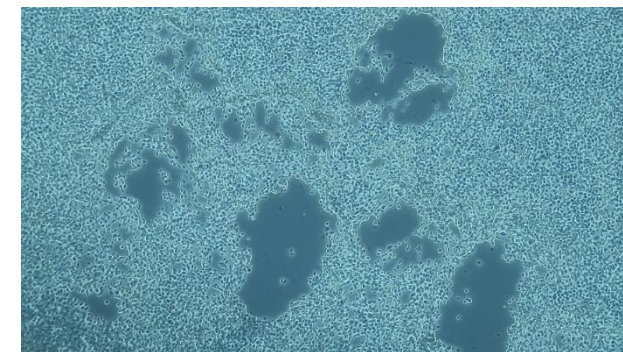


アッセイ後

ウェルの左端



コラーゲンコート: 中心部



コラーゲンコートでもHEK293細胞の接着性は良くなるが、アッセイをするとウェル内の一部で細胞がはがれることを確認

発現細胞を用いた機能評価 ③取り込み試験

基質試験を行う場合

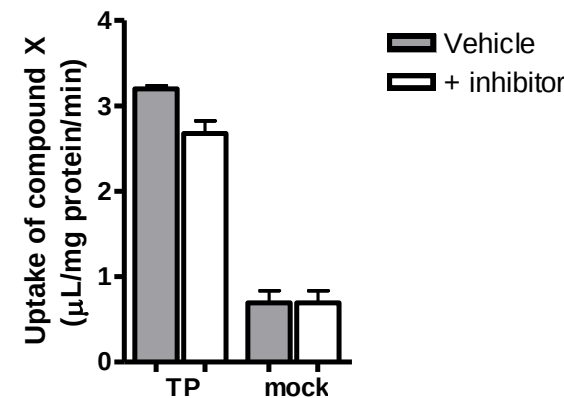
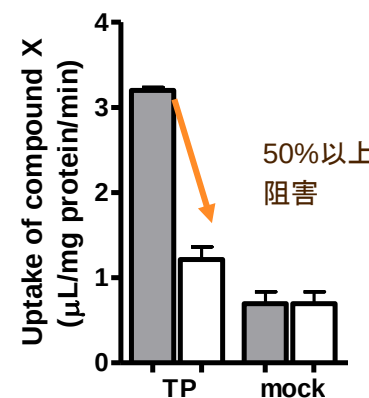
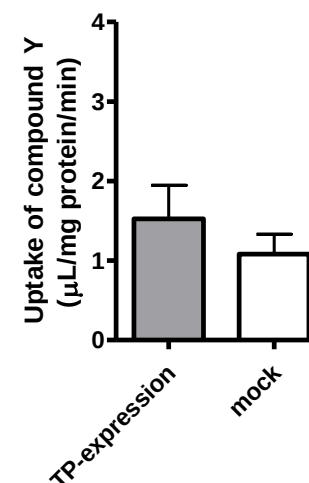
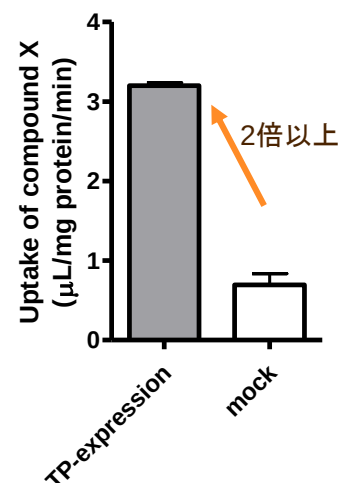
1. 親細胞株又は空のベクターを導入した非発現細胞株と比較する。
2. トランスポーターの阻害薬の存在下と非存在下で比較する。

基質試験に用いることが出来る材料

1. トランスポーター遺伝子を導入した発現細胞株
2. ヒト肝細胞又は肝細胞株 (懸濁、接着いずれも可)
: 個々のトランスポーターに比較的特異性のある阻害剤を用いた阻害試験の実施をするべき

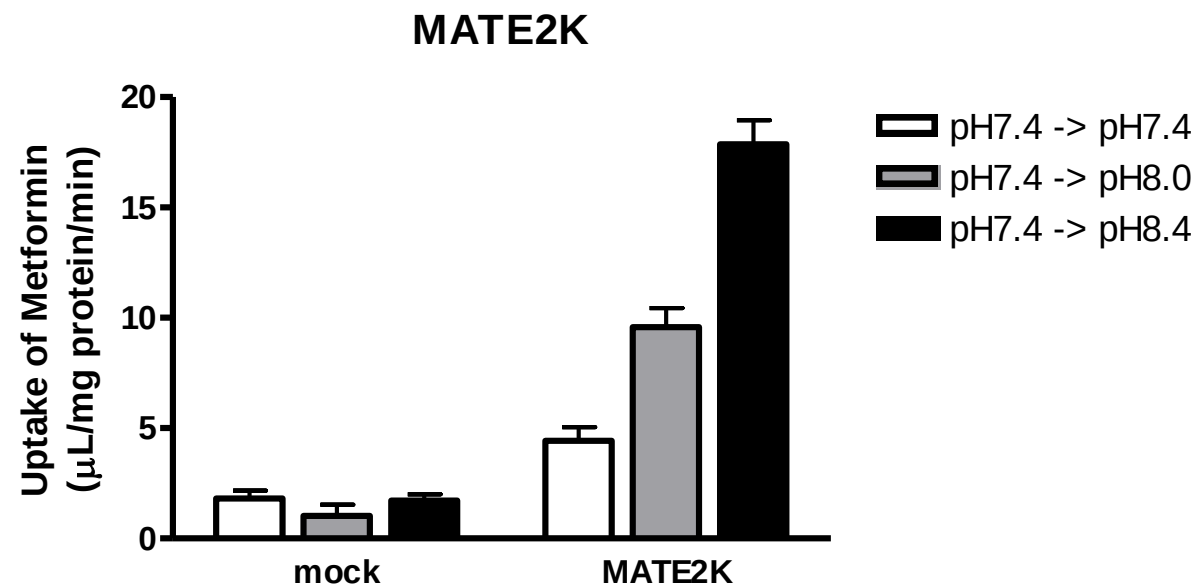
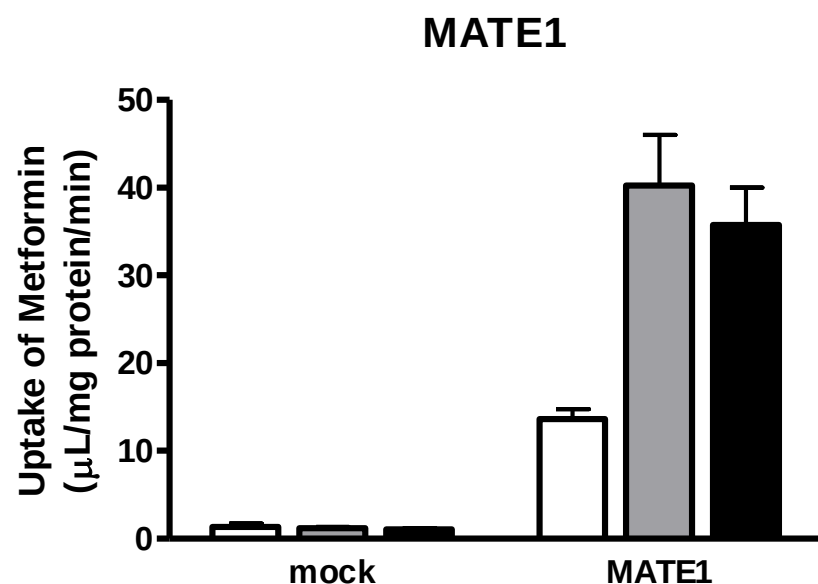
カットオフ値

トランスポーター発現細胞における被験薬の取り込みが、非発現細胞における取り込みと比較して顕著であり(例、非発現細胞の **2倍以上**)、かつトランスポーターの既知の阻害薬によって **50%**を超えて阻害される場合

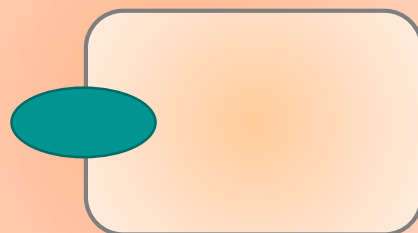


■ Vehicle
□ + inhibitor

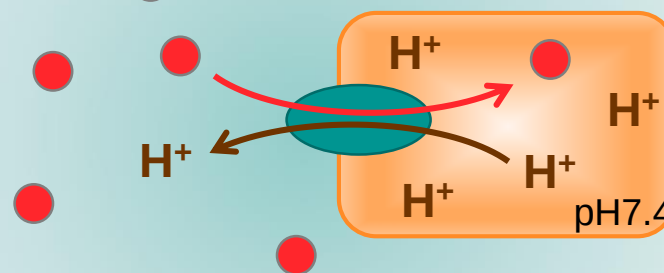
発現細胞を用いた機能評価 ④ pH依存性-1



プレインキュベーション: pH7.4

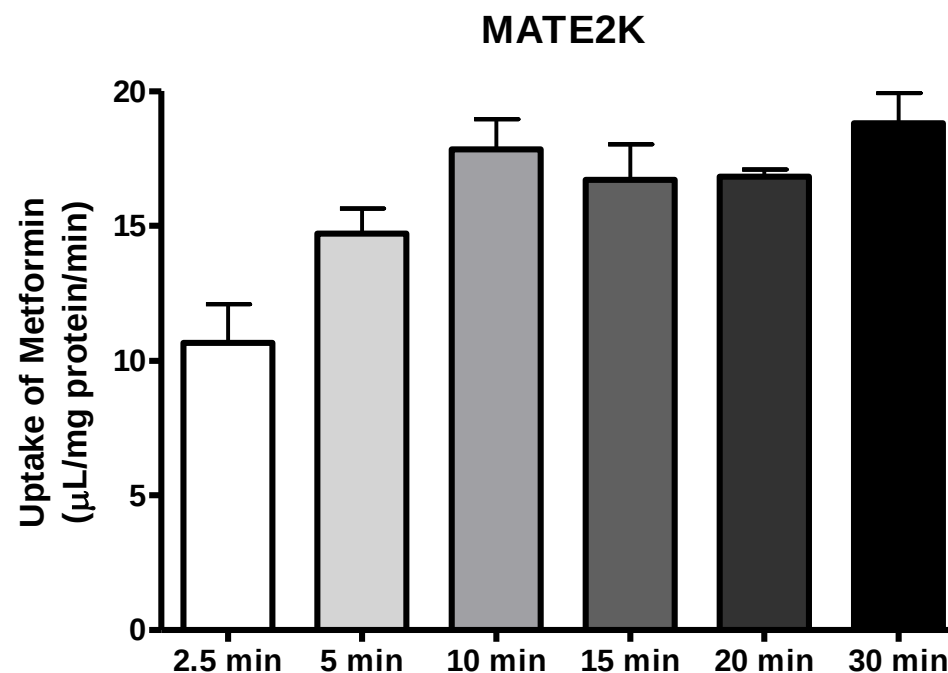
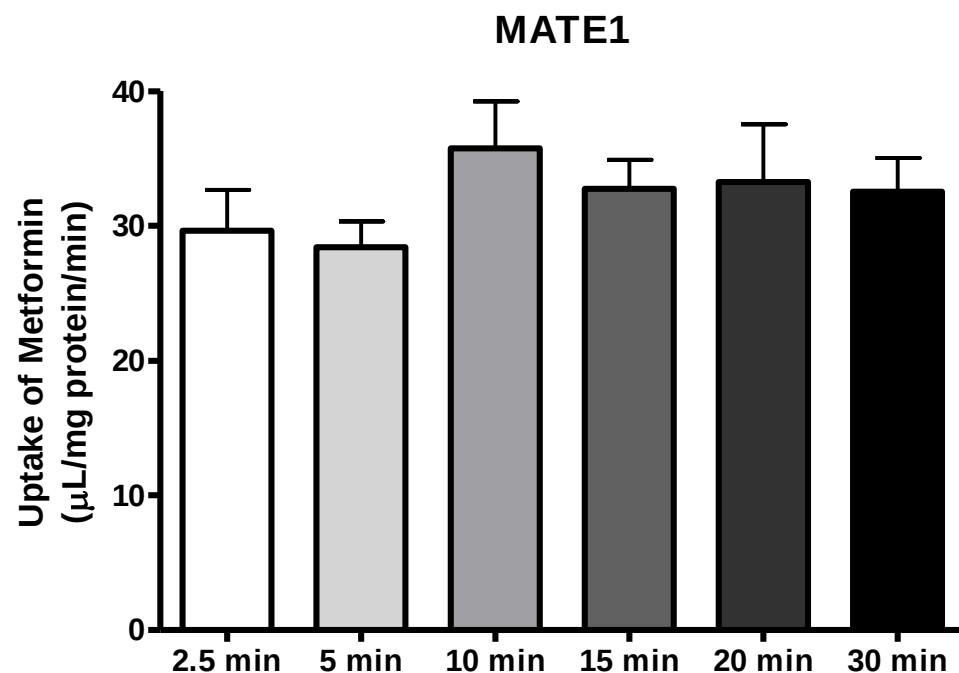


pH8.0 or 8.4



発現細胞を用いた機能評価 ⑤ pH依存性-2

プレインキュベーション時間の活性への影響



→ プレインキュベーションの時間は10分に設定するのが良さそうだ。安定した結果を得るためには出来るだけプレインキュベーションの時間は揃えた方が良い。

発現細胞を用いた機能評価 ⑥ 阻害試験

阻害試験を行う場合

トランスポーター発現細胞株のみを用いて、既知のプローブ基質の取り込みを評価することにより。
 プローブ基質濃度はそのトランスポーターに対する K_m 値より低い濃度を使用する。
 → 基質濃度は $[S] \ll K_m$ としておくと $K_i \approx IC_{50}$ と扱ってもよい

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

阻害試験に用いることが出来る材料

1. トランスポーター遺伝子を導入した発現細胞株
2. ヒト肝細胞又は肝細胞株 (懸濁、接着いずれも可): できるだけトランスポーター特異性の高いプローブ基質を使用する

カットオフ値

OATP1B1, OATP1B3	$IC_{50,u} > 10 \times C_{\max, \text{inlet}, u} (C_{\max, \text{inlet}, u} / IC_{50,u} < 0.1)$
OAT1, OAT3, OCT2	$IC_{50,u} > 10 \times C_{\max, u} (C_{\max, u} / IC_{50,u} < 0.1)$
MATE1, MATE2K	$IC_{50,u} > 50 \times C_{\max, u} (C_{\max, u} / IC_{50,u} < 0.02)$

- $C_{\max, u}$: 治療用量の定常状態における阻害薬の非結合形 $C_{\max}$
- $C_{\max, \text{inlet}, u}$: 肝臓入り口での阻害薬の推定非結合形 $C_{\max}$
 $C_{\max, \text{inlet}, u} = f_{u,p} \times (C_{\max} + (Fa \times Fg \times ka \times \text{投与量}) / Qh / RB)$
 - ・ 不明であれば、 $Fa=1$ 、 $Fg=1$ 、 $ka=0.1/\text{min}$ をワーストケースの推定値として用いることができる。
 - ・ $f_{u,p}$ が1%未満の実測値に信頼性が示せない場合は、 $f_{u,p}$ を1%に設定する

発現細胞を用いた機能評価 ⑦ 阻害試験

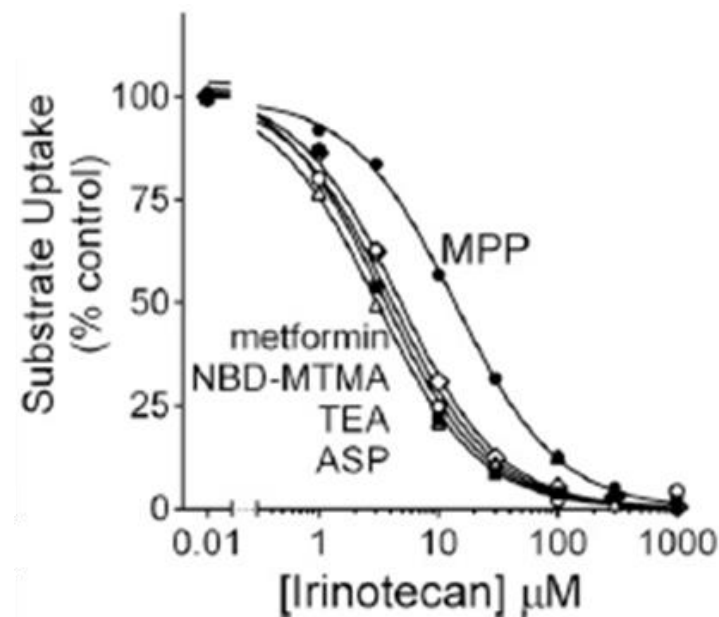
基質依存的阻害

OATP1B1における基質依存的阻害

Substrates	Inhibitors		
	CsA ^a	Rifampin	Gemfibrozil
	<i>K_i</i> , μ M		
In vitro prototypical probe substrates			
E ₂ G ^b	0.118 ± 0.015	0.585 ± 0.074	26.4 ± 2.1
E ₁ S ^b	0.732 ± 0.224	6.96 ± 1.31	381 ± 60
BSP ^b	0.694 ± 0.149	2.75 ± 0.62	173 ± 34
Clinically used substrate drugs			
Pitavastatin	0.228 ± 0.027	1.07 ± 0.08	58.8 ± 10.7
Atorvastatin	0.160 ± 0.016	0.922 ± 0.122	46.0 ± 8.9
Fluvastatin	0.157 ± 0.016	1.05 ± 0.19	72.7 ± 8.7
Rosuvastatin	0.301 ± 0.031	0.952 ± 0.098	63.6 ± 8.4
Pravastatin	0.184 ± 0.046	0.653 ± 0.117	9.65 ± 2.79
Repaglinide	0.0857 ± 0.0330	0.598 ± 0.198	48.3 ± 18.6
Nateglinide	0.244 ± 0.038	0.358 ± 0.079	252 ± 100
Glibenclamide	0.102 ± 0.005	0.442 ± 0.102	29.6 ± 5.2
Bosentan	0.206 ± 0.056	0.694 ± 0.211	36.6 ± 5.8
Valsartan	0.138 ± 0.017	0.377 ± 0.022	13.4 ± 0.3
Torsemide	0.486 ± 0.112	1.23 ± 0.30	49.5 ± 10.8
Fexofenadine	0.0771 ± 0.0100	0.423 ± 0.032	31.4 ± 4.3

Izumi S et al. *Drug Metab Dispos.* 43:235-47. 2015

OCT2における基質依存的阻害



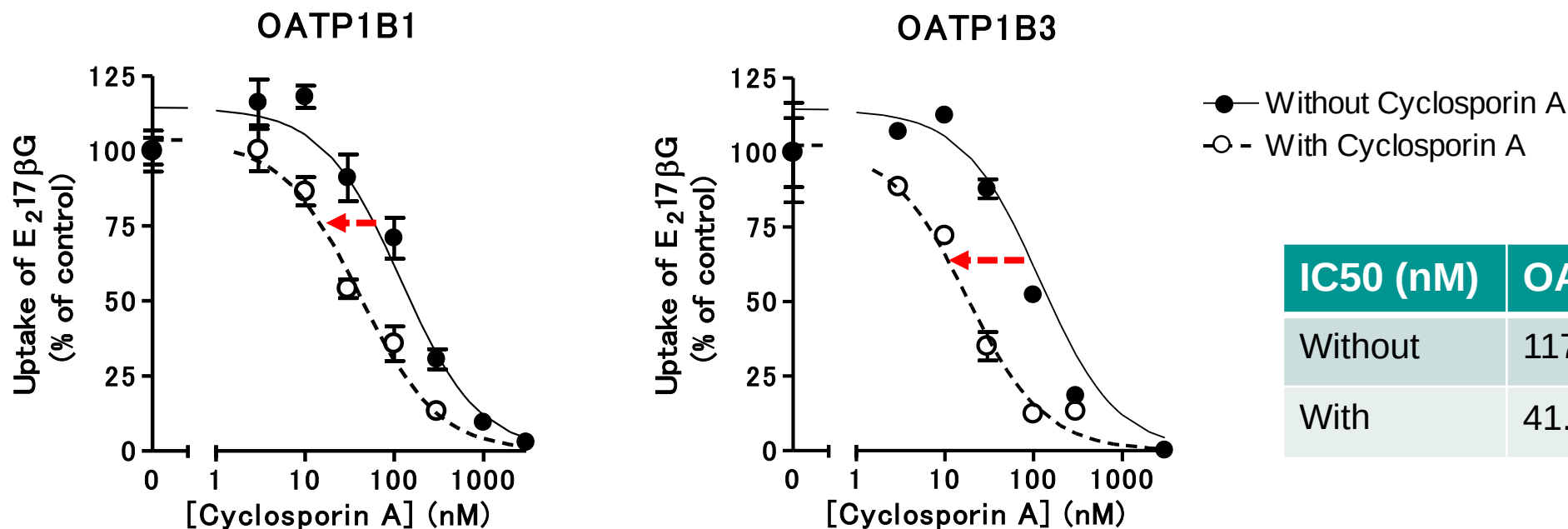
Sandoval P et al. *Mol Pharmacol.* 94:1057-1068. 2018

プローブ基質によりIC50が異なる

→より厳しいIC50が得られるプローブ基質、あるいは臨床での併用を考慮した基質を使用する

発現細胞を用いた機能評価 ⑧ 阻害試験

時間依存的阻害



IC50 (nM)	OATP1B1	OATP1B3
Without	117.3±26.8	88.3±22.1
With	41.1±10.5	17.9±3.7

測定条件:

基質: 100 nM [³H]-Estradiol 17β-glucuronide ([³H] Substrate : Carrier = 1: 4)

阻害剤: Cyclosporin A

プレインキュベーション時間: 30 min

反応時間: 2.5 min

Without cyclosporin A: 通常のアッセイバッファー

With cyclosporin A: Cyclosporine Aを含んだアッセイバッファー

*in vitro*評価における基質及び阻害薬の例

Table 10: Examples of substrates for transporters (*In Vitro* Studies)

Transporter	Substrate
P-gp	Digoxin, <i>N</i> -methyl-quinidine (NMQ), Quinidine, Vinblastine
BCRP	Estrone-3-sulfate, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), Prazosin, Rosuvastatin, Sulfasalazine
OATP1B1, OATP1B3	Cholecystokinin octapeptide (CCK-8, selective for OATP1B3), Estradiol-17 β -glucuronide, Pitavastatin, Pravastatin, Rosuvastatin
OAT1	Adefovir, Cidofovir, <i>p</i> -aminohippurate (PAH), Tenofovir
OAT3	Benzylpenicillin, Estrone-3-sulfate, Methotrexate
MATE1, MATE2-K	Creatinine, Metformin, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), Tetraethylammonium (TEA)
OCT2	Creatinine, Metformin, Tetraethylammonium (TEA)

Table 11: Examples of inhibitors for transporters (*In Vitro* Studies)

Transporter	Inhibitor
P-gp	GF120918 (dual P-gp/BCRP inhibitor), Verapamil, Valspodar (PSC833), Zosuquidar (LY335979)
BCRP	Fumitremorgin C, GF120918 (dual P-gp/BCRP inhibitor), Ko143, Novobiocin
OATP1B1, OATP1B3	Bromosulphophthalein (BSP), Cyclosporine, Rifampin, Rifamycin SV
OAT1, OAT3	Benzylpenicillin*, Probenecid
MATE1, MATE2-K	Cimetidine, Pyrimethamine, Quinidine
OCT2	Cimetidine, Clonidine, Pyrimethamine, Verapamil

* Relatively selective inhibitor for OAT3.

まとめ

- ◆ SLCトランスポーターとはエネルギーを使わずに溶質を細胞の内外に運ぶタンパク質ファミリー
- ◆ 薬物動態では小腸、肝臓、腎臓、血液脳関門といったところに発現し、主に物質の取り込みを行っている
- ◆ 評価にはトランスポーター発現細胞や肝細胞、肝細胞株が用いられる
- ◆ 適切な試験条件を設定する
 - プレートのコーティング
 - 有機溶媒の濃度
 - バッファー組成 (pH等)
 - プレインキュベーションの時間や条件
 - (阻害試験において)プローブ基質の選定や濃度