

いまさら聞けない トランスポーターの基礎 －入門編－

第6回 トランスポーター輸送活性の測定方法・データ解析

株式会社ジェノメンブレン

いまさら聞けないトランスポーターの基礎 - 入門編 -

- ・第1回 2025年6月18日 : 薬物動態概要 (ADMEについて、トランスポーター試験がなぜ必要か?)
- ・第2回 2025年7月16日 : 細胞培養について
- ・第3回 2025年8月20日 : SLCトランスポーター試験について
- ・第4回 2025年9月17日 : Transcellular試験について
- ・第5回 2025年10月15日 : Vesicular assayについて
- ・第6回 2025年11月19日 : トランスポーター輸送活性の測定方法・データ解析 (全体総括)

取込実験における計算

トランスポーター発現細胞(HEK293, membrane vesicles等)
を用いた実験から得られるパラメーター

実験条件

- ・基質濃度 $[S]$ (μM)
- ・取込時間 T (min)

結果

- ・取り込まれた物質量 N (pmol)
- ・タンパク量 mg protein

SI単位

物質量	mol (N)
長さ	m (L)
時間	s (T)
質量	kg (M)

$$\text{取込速度 } v = N/T \text{ (pmol/min)} \longrightarrow \text{取込クリアランス } v/[S] \text{ (\mu L/min)}$$

*In vitro*試験系における注意点

$IC_{50,u}$ 、 $K_{i,u}$ とICH M12 (2024) で明文化

実際の有効薬物濃度が設定濃度から乖離する要因

- ・水への溶解性
- ・化合物の安定性
- ・非特異的な結合 ($f_{u,inc}$)

タンパク結合性の高い薬物のタンパク結合率の測定値の不確実さを考慮して、規制当局は $f_{u,p}$ (血漿中非結合形分率) を 0.01 (即ち、1%) に設定することを推奨してきた。タンパク結合率の測定系の真度及び精度が実証されていれば、実測の $f_{u,p}$ 値を利用できる。

※高濃度の場合には細胞毒性にも注意

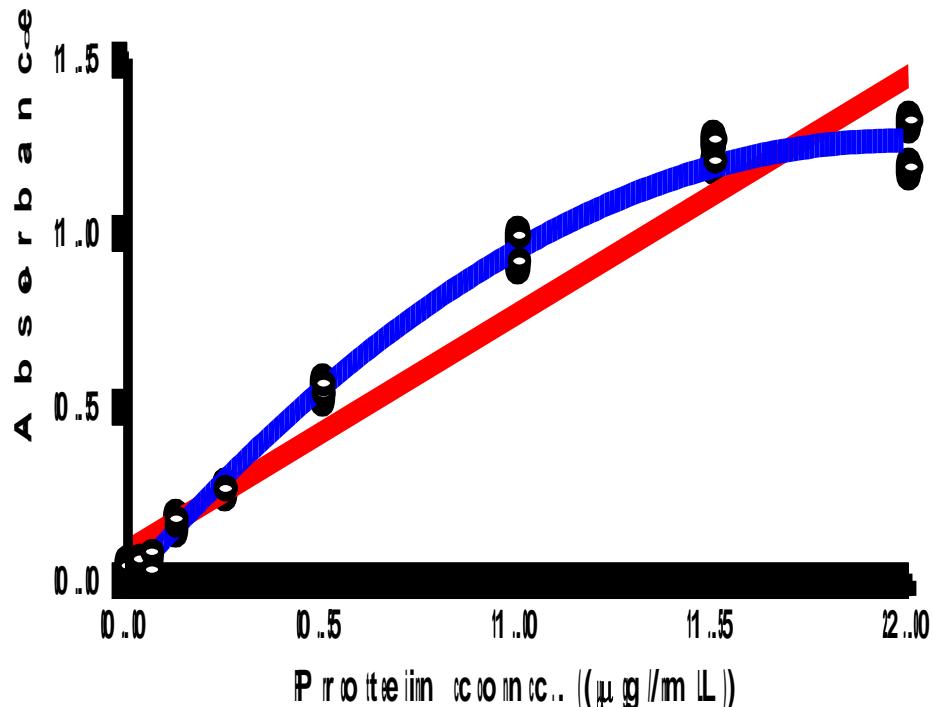
<https://www.pmda.go.jp/files/000272132.pdf>

データの質と解析方法 (タンパク定量)

問い合わせ: 発現細胞で活性は出たがデータシートと絶対値が異なる

$$Y = 0.684x + 0.0871, r^2 = 0.945$$

$$Y = -0.325x^2 + 1.29x - 0.00562, r^2 = 0.998$$



ランベルト・ベールの法則

$$A_\lambda = \epsilon cl \quad (c: \text{濃度}, l: \text{光路長})$$

Conc.	OD560	
	Blank	0.205
0	0.239	0.288
0.03125	0.314	0.308
0.0625	0.277	0.328
0.125	0.406	0.423
0.25	0.512	0.511
0.5	0.783	0.813
1	1.164	1.238
1.5	1.514	1.452
2	1.57	1.435

フィッティングモデルの選択

トランスポーター介した輸送

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

単純拡散
+ $PS_{dif} \cdot S$

結合部位が2つある場合

$$+ \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{m2} + S}$$

- ・パラメータ数を増やした方が残差平方和は小さくなるが、AIC等の統計指標で判断
- ・Eadie-Hofstee plot等の線形化は図示には適しているが、フィッティングは非線形回帰手法を用いる

阻害実験の場合

$$CL_{uptake(+Inhibitor)} = \frac{CL_{uptake(control)}}{1 + I/IC_{50}} + PS_{dif}$$

$$y = S_{inf} + \frac{S_0 - S_{inf}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - \log x)Hillslope}}$$

相互作用の可能性評価

In vitro パラメーター
(IC₅₀)

Basic model

Static model

Dynamic model
(PBPKモデル)

In vivo DDI 試験

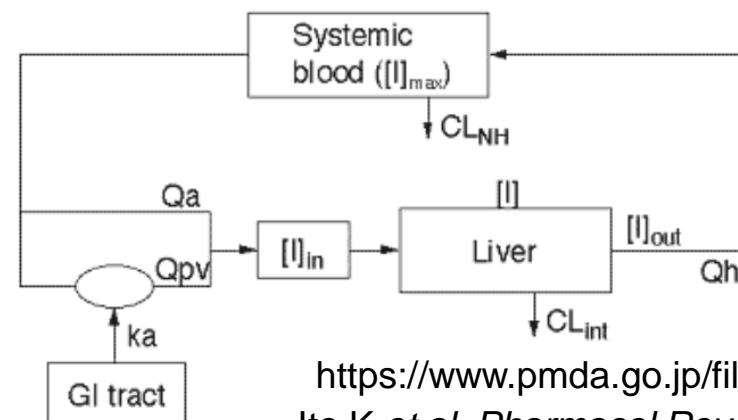
表 1: トランスポーターの阻害薬としての推奨比及びカットオフ値

P-gp 又は BCRP	$IC_{50,u}^* > 0.1 \times (\text{投与量}/250 \text{ mL})$ (即ち、 $(\text{投与量}/250 \text{ mL})/IC_{50,u} < 10$) 経口投与薬の場合
OATP1B1 又は OATP1B3	$IC_{50,u} > 10 \times C_{max, inlet,u}^{\#}$ (即ち、 $C_{max,inlet,u}/IC_{50,u} < 0.1$)
OAT1、OAT3、OCT2	$IC_{50,u} > 10 \times C_{max,u}$ (即ち、 $C_{max,u}/IC_{50,u} < 0.1$)
MATE1/MATE2-K	$IC_{50,u} > 50 \times C_{max,u}$ (即ち、 $C_{max,u}/IC_{50,u} < 0.02$)

Cは血漿中濃度

$$C_{max,inlet,u} = f_{u,p} \times (C_{max} + \frac{F_a \cdot F_g \cdot k_a \cdot D}{Q_h \cdot R_B})$$

$$\nu_{max} = (Q_a + Q_{pv}) \times C_{max} + F_a \cdot F_g \cdot k_a \cdot D$$



Basic vs Static model

両薬物を同時に経口投与した際に、相互作用によって生じる被相互作用薬の血中濃度上昇を予測せよ。両薬物は肝代謝および尿中排泄によって消失し、肝臓での体内動態はwell-stirred modelによって記述できる。

[I] (mM)	(a) [I] _{max}	(b) [I] _{max,u}	(c) [I] _{u,in,max}
	8.385	0.258	1.23
[I]/K _i	335	10	49
CL _{int(+I)/CL_{int}}	0.202	0.271	0.216
AUCR	3.73	3.03	3.57

Basic Static

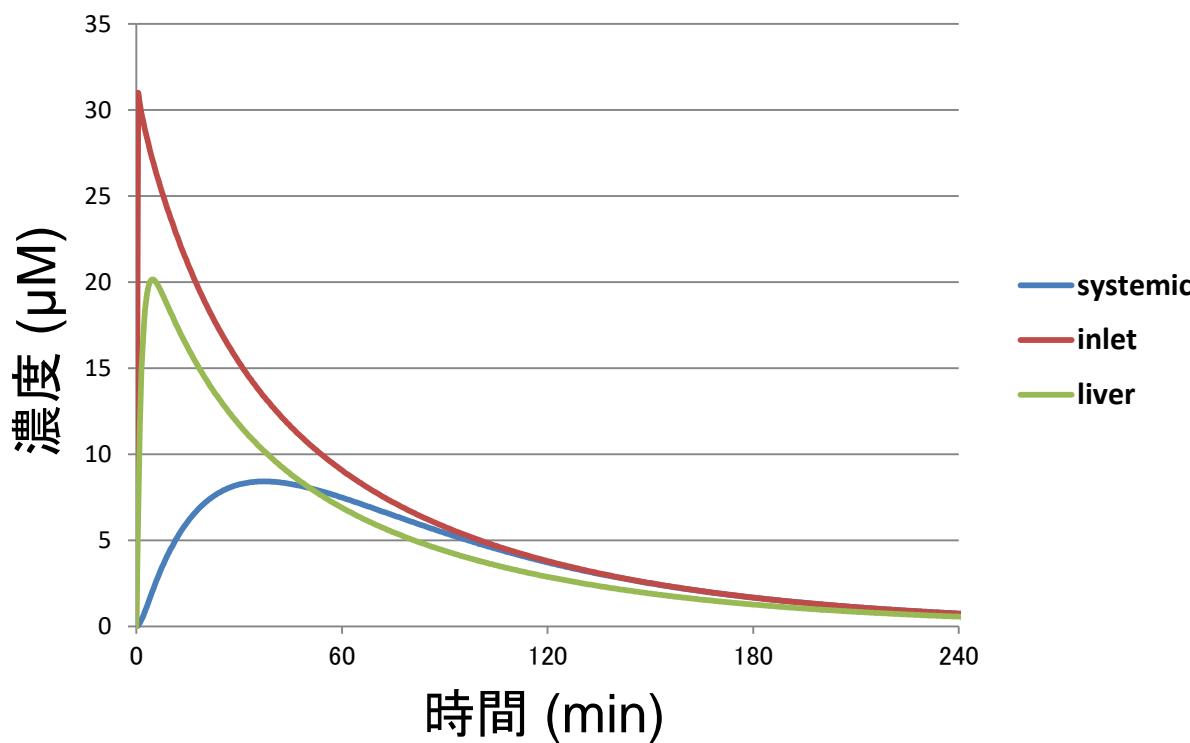
$$\frac{AUC(+I)}{AUC} = \frac{\frac{F_h(+I)}{CL_h(+I) + CL_r}}{\frac{F_h}{CL_h + CL_r}}$$

	被相互作用薬 (object)	相互作用薬 (precipitant)
D (μmol)	400	1000
F _a	0.75	0.95
k _a (min ⁻¹)	0.03	0.05
f _p	0.05	0.02
R _B	0.9	0.65
CL _{tot} (L/min)	0.3	0.7
f _e	0.1	0.45
V _d (L)	50	50
K _{p, liver}	1	1
I _{max} (μM)	—	12.9
f _m for CYP1A2	0.8	—
K _i for CYP1A2 (μM)	—	0.025

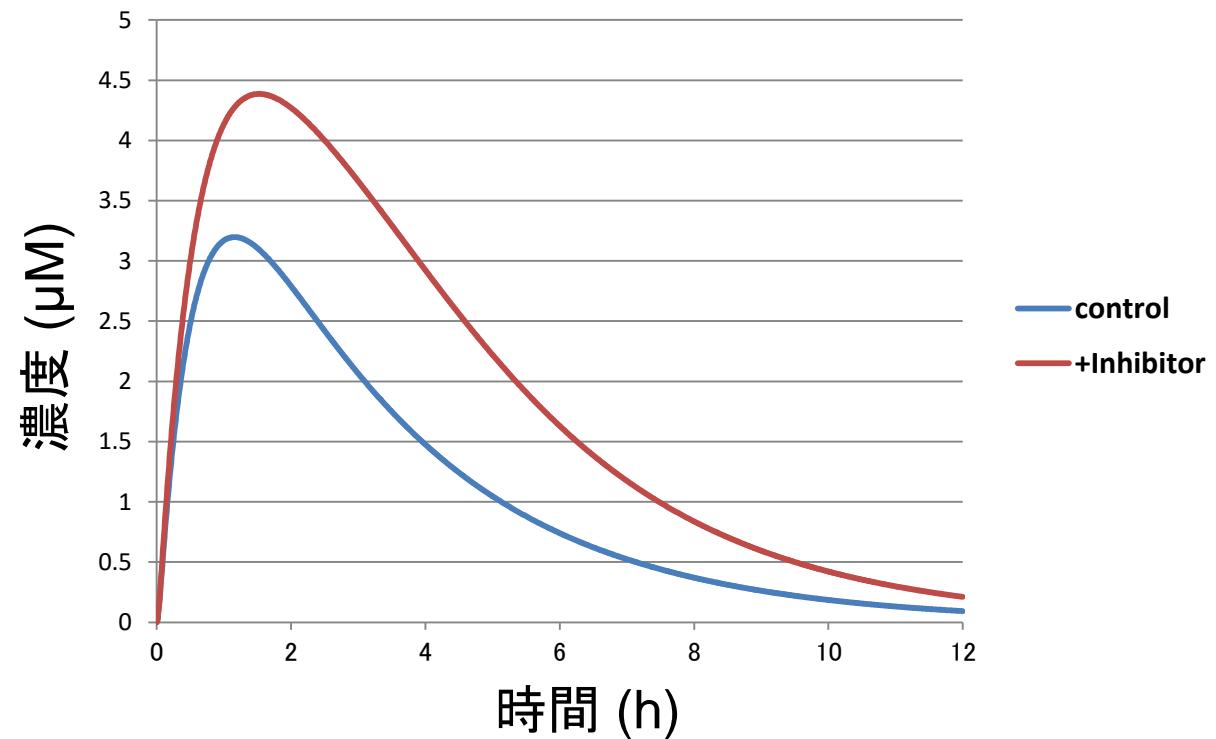
Q _h (L/min)	1.5
V _{liver} (L)	2.8
V _{inlet} (L)	0.07

Dynamic model

阻害剤血中濃度推移



血中濃度推移

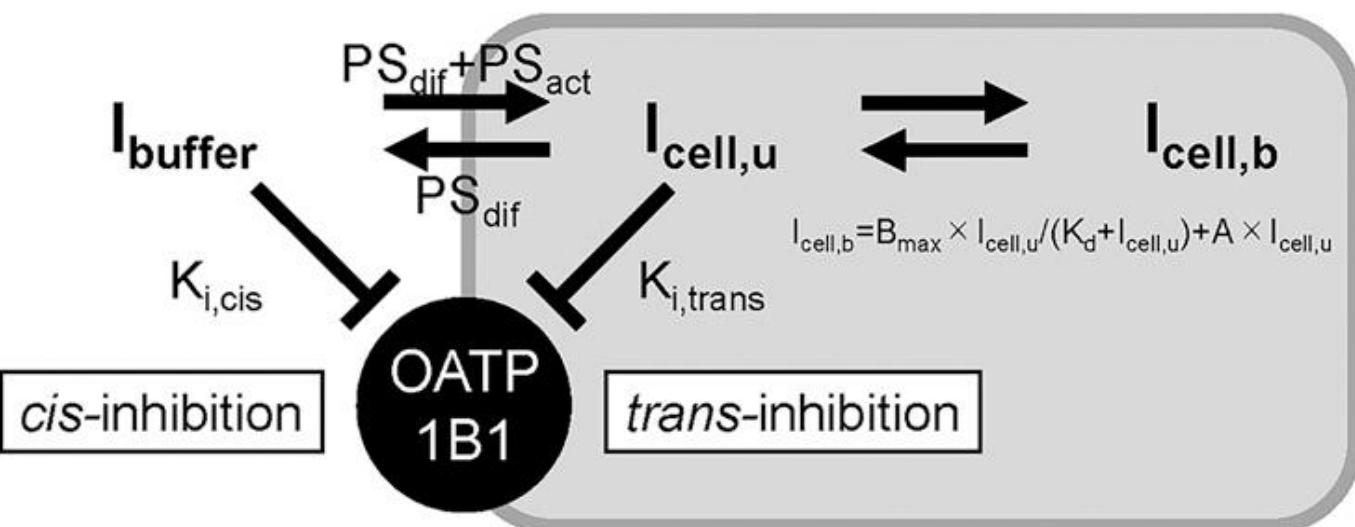
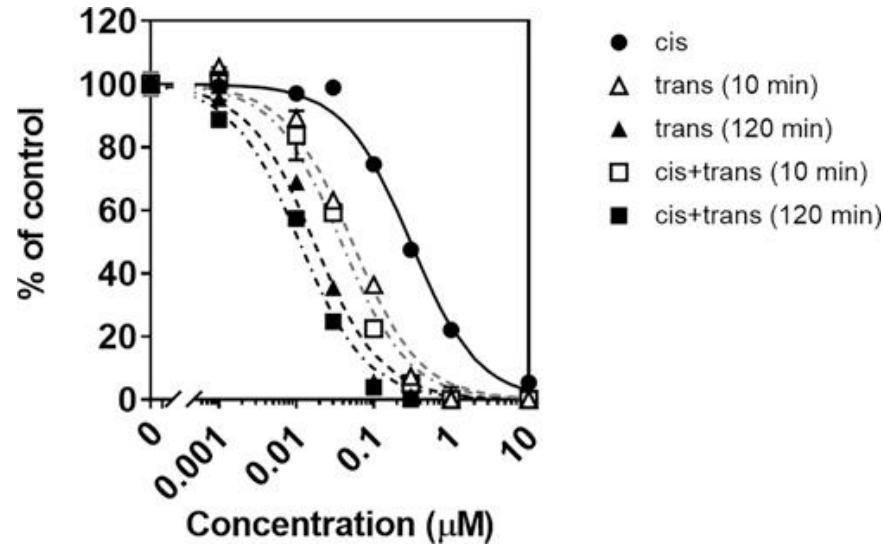


Static modelで計算した $[I]_{\text{in, max}}$ は41 μM であり、dynamic modelでシミュレーションした値より高かった

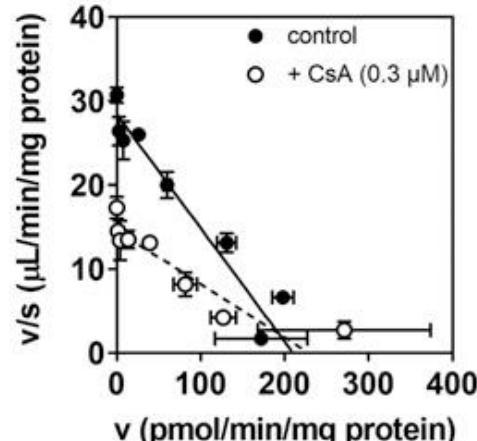
$AUC_{0-12}: 804 \mu\text{M}\cdot\text{h} \rightarrow 1377 \mu\text{M}\cdot\text{h} (\times 1.71)$

OATP1B1のプレインキュベーション時間依存的阻害のメカニズム

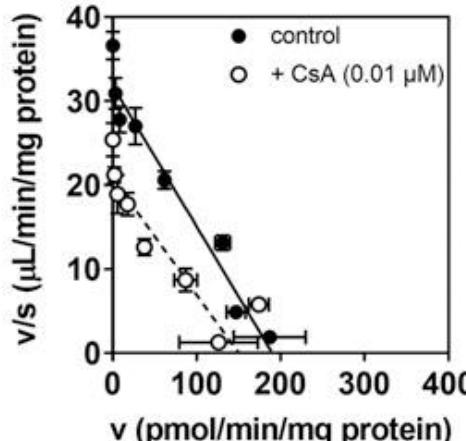
Cyclosporine Aによるプレインキュベーション時間依存的阻害効果



A Cis阻害



B Trans阻害



$$CL_{OATP1B1+I} = \frac{V_{max}}{K_m \cdot (1 + I_{buffer}/K_{i,cis}) + S} \cdot \left(\frac{1}{1 + f_T \cdot I_{cell}/K_{i,trans}} \right)$$

プレインキュベーション時間依存的な阻害が見える条件

細胞内濃度が半定常状態に達するまでの時間

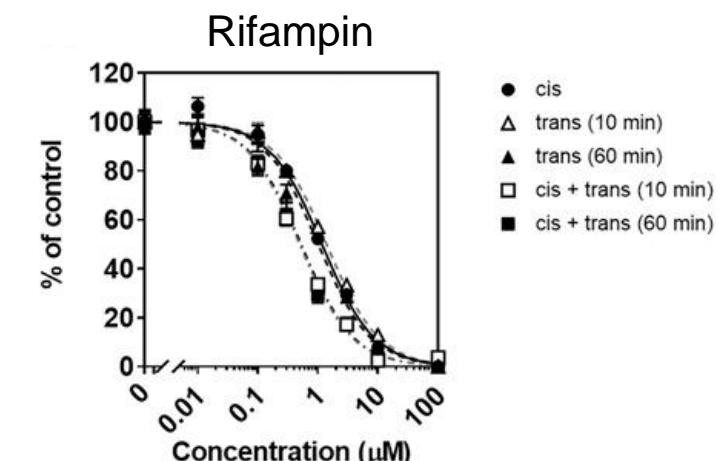
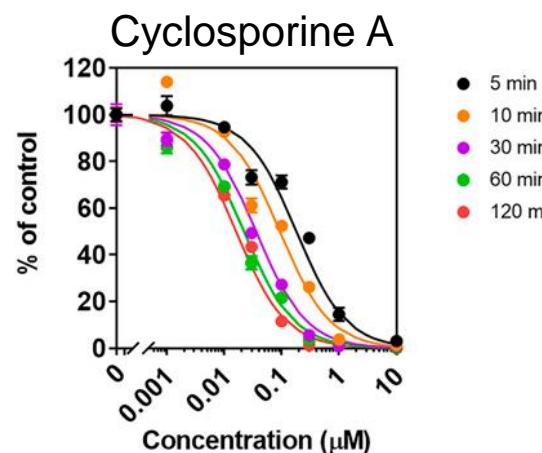
$$T_{1/2} = \frac{0.693 \times V_{cell}}{PS_{dif} \times f_T}$$

定常状態での阻害強度

$$\text{Cis阻害} = 1 + I_{\text{buffer}}/K_{i, \text{cis}}$$

$$\begin{aligned} \text{Trans阻害} &= 1 + f_T \cdot I_{\text{cell}}/K_{i, \text{trans}} \\ &= 1 + \alpha \cdot K_{p, \text{uu}} \cdot I_{\text{buffer}}/K_{i, \text{cis}} \end{aligned}$$

	Cyclosporine A	Rifampin
f_T	0.000254	0.0311 ± 0.0009
PS_{dif} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)	51.3 ± 13.8	52.5 ± 2.2
$K_{p, \text{uu}}$	1	2.25
$K_{i, \text{cis}}$ (μM)	0.297 ± 0.027	1.16 ± 0.01
$K_{i, \text{trans}}$ (μM)	0.00619 ± 0.00138	1.56 ± 0.10
α : $K_{i, \text{cis}}$ -to- $K_{i, \text{trans}}$ ratio	48.0	0.744

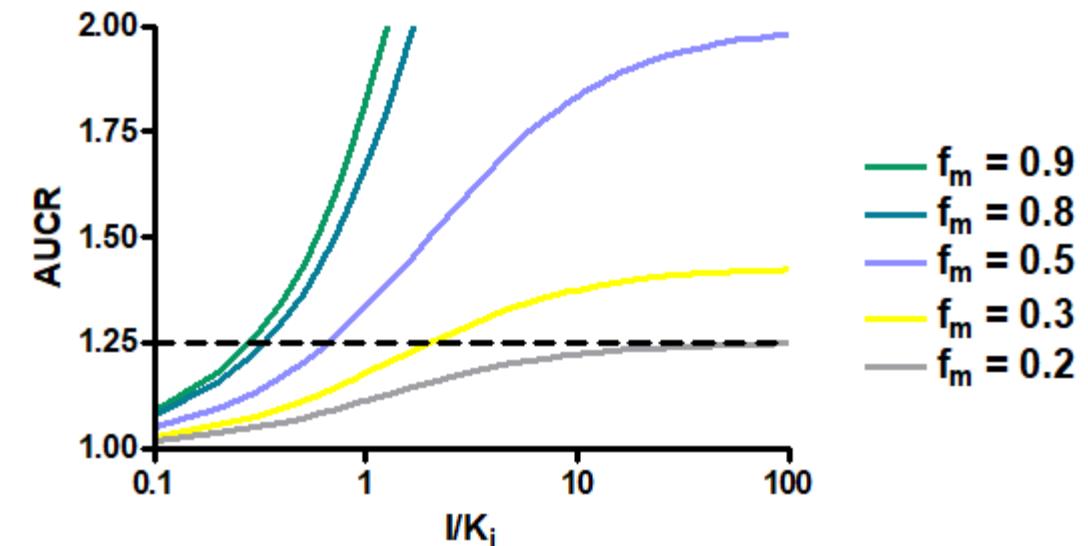
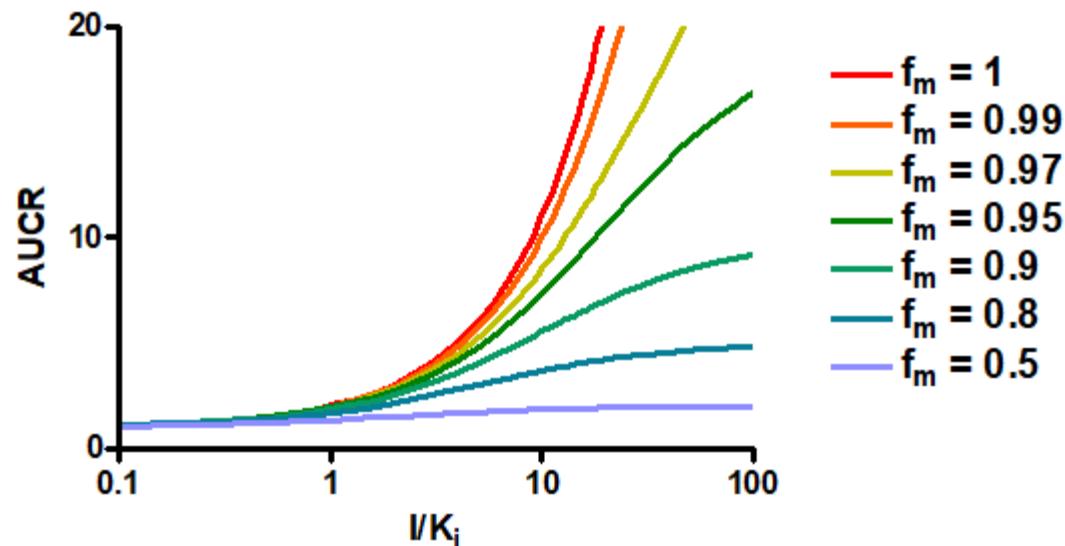


- PS_{dif} や f_T が小さい → 細胞内非結合濃度($I_{\text{cell},u}$)が定常状態に達するまでに時間がかかり、阻害の最大効果も遅れる。
- α および $K_{p,uu}$ が大きい → $I_{\text{cell},u}$ が高くなり、trans および cis+trans 阻害がより強力になる。

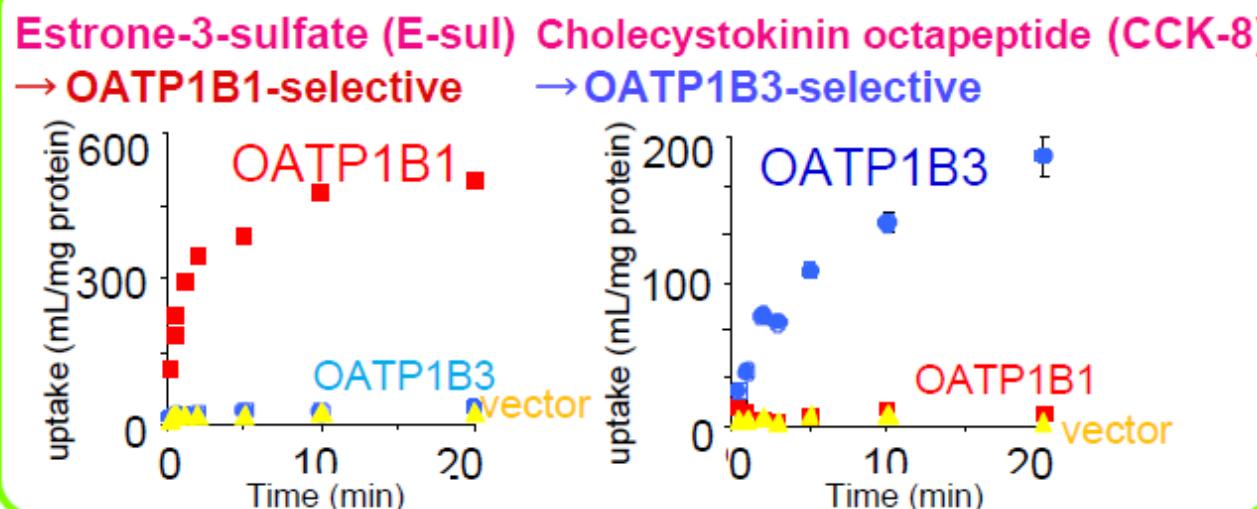
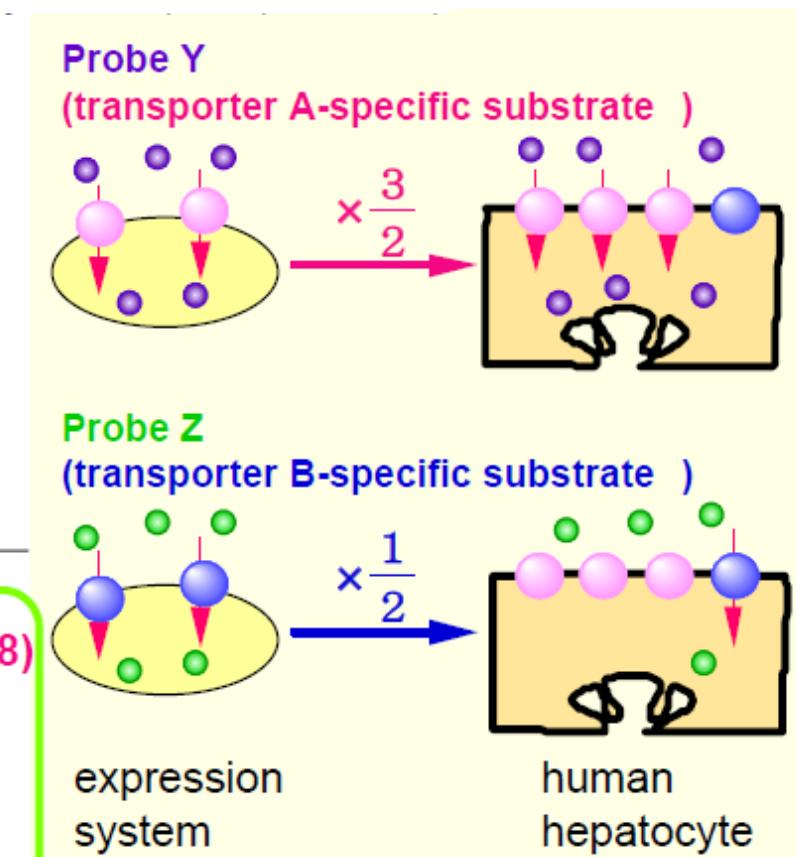
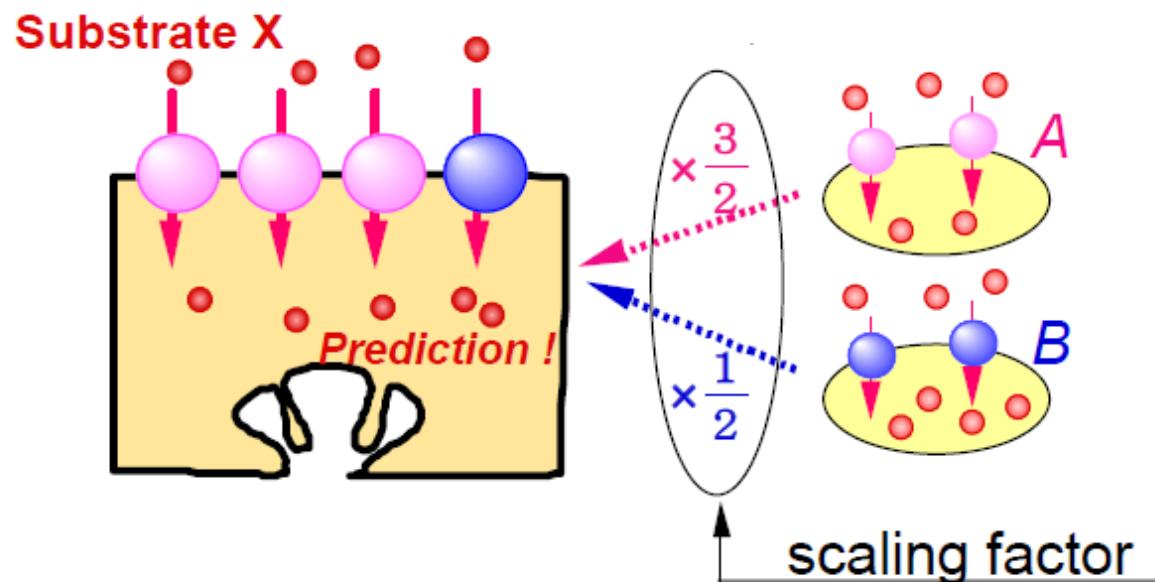
相互作用を受ける消失経路の割合の影響

消失経路が肝臓のみの場合

$$\frac{AUC_{po}(+inhibitor)}{AUC_{po}(control)} = \frac{CL_{int}(control)}{CL_{int}(+inhibitor)} = \frac{1}{\frac{f_m}{1 + [I]/K_i} + (1 - f_m)}$$

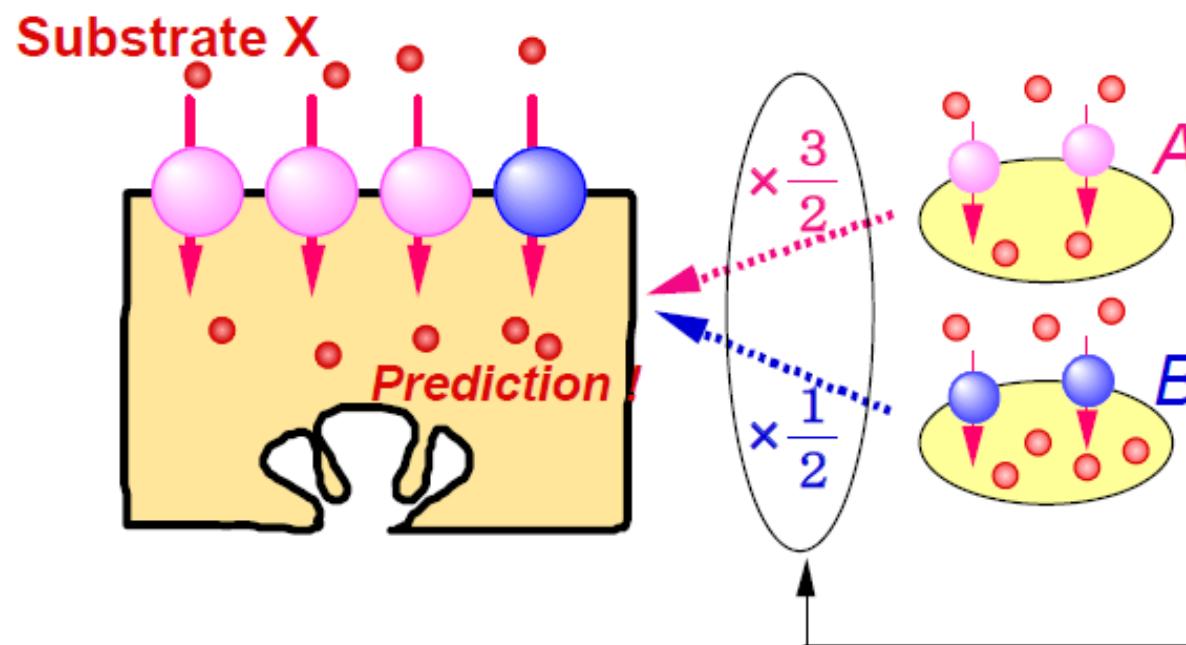


Relative activity factor (RAF) method

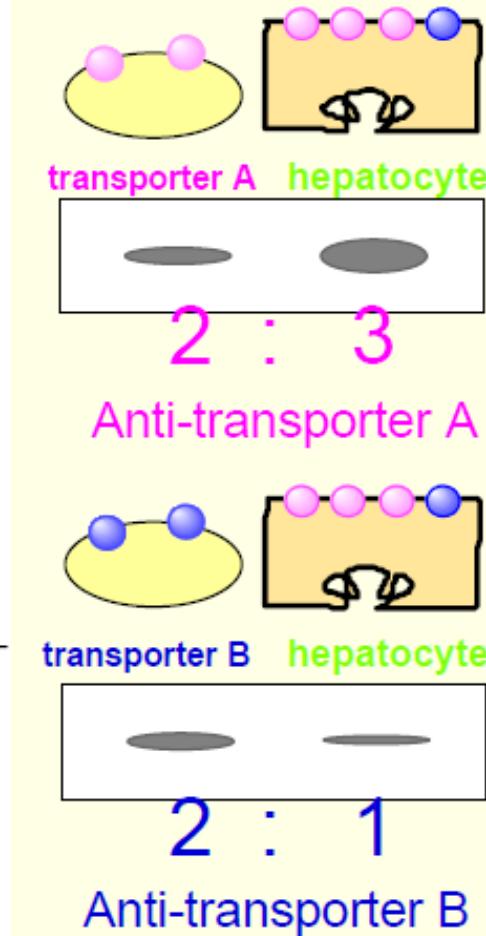


Hirano M TK et al. J Pharmacol Exp Ther. 311:139-46. 2004
 Maeda K. Biol Pharm Bull. 38:155-68. 2015

Relative expression factor (REF) method



$$R = \frac{\text{expression level} \text{ (hepatocyte: } /10^6 \text{ cells)}}{\text{expression level} \text{ (expression system: } / \text{mg protein})}$$



REF法によるrosvastatinの胆汁排泄固有クリアランスの予測

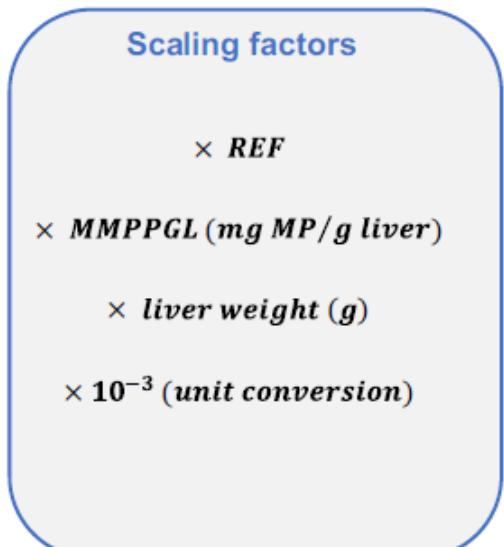
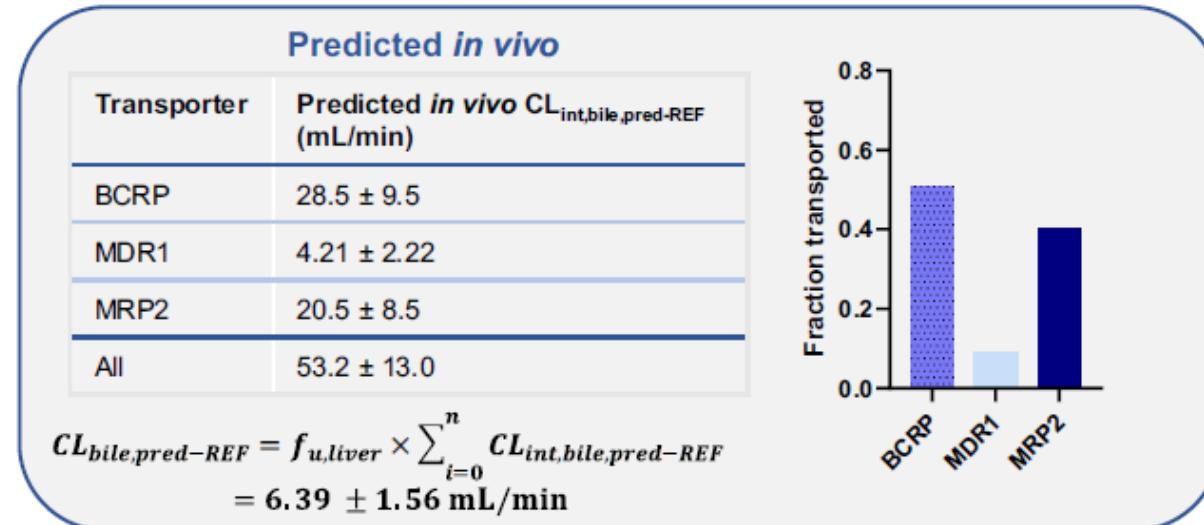
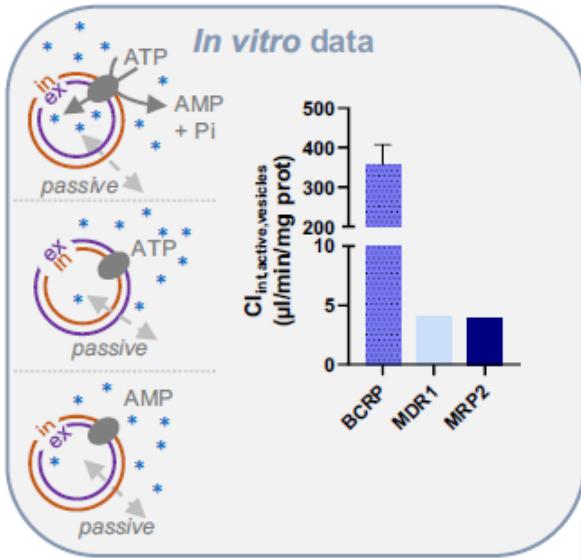


Table 1 *In vitro-in vivo* extrapolation of rosuvastatin CL_{bile} using the REF approach

Transporter	<i>In vitro</i> $\text{Cl}_{\text{int,active,vesicles}}$ ($\mu\text{L}/\text{minute}/\text{mg protein}$)	REF	Predicted <i>in vivo</i> $\text{CL}_{\text{int,bile,pred-REF}}$ (mL/minute)	f_t	Predicted <i>in vivo</i> $\text{CL}_{\text{bile,pred-REF}}$ (mL/minute)	Observed (PET-imaged) <i>in vivo</i> CL_{bile} (mL/minute) ¹¹	P/O
BCRP	$356 \pm 62 (n = 3)$	0.0014 ± 0.0005	28.5 ± 9.5	0.54	—	—	—
MRP2	5.58, 2.28	0.0181 ± 0.0095	20.5 ± 8.5	0.39	—	—	—
MDR1	2.83, 5.38	0.0925 ± 0.0384	4.21 ± 2.22	0.08	—	—	—
Total	—	—	53.2 ± 13.0	—	6.39 ± 1.56	5.08 (3.17–6.98)	1.26 ± 0.55

DMPKのSpecial Issue

ISSXとJSSXのofficial journalであるDrug Metabolism and Pharmacokineticsからspecial issueが2026年の第1クオーターに出版予定

Gileadのチームを中心に10社で共著を準備中

Applications of In Vitro Transporter Assays for Studying Transporter Interactions and Predicting Clinical Drug-Drug Interactions

- ・レギュラトリーガイダンス
- ・in vitroトランスポーター試験系 (含primary cell, CIVM)
- ・内因性バイオマーカー
- ・In vitroからin vivoへの変換:考慮事項と課題
- ・PBPKモデリング
- ・現状の課題と今後の可能性