

心筋イオンチャネルに対する阻害活性評価サービス

●オートパッチクランプシステムを用いた CiPA プロトコール による hERG 試験

TN525

hERG Assay with CiPA Protocol Using an Automated Patch-Clamp System

[概要]

当社では、開発初期のスクリーニング段階でもレギュレーションに準じた条件下 (CiPA プロトコール推奨の「生理的温度 (35~37°C)」および「電圧プロトコール」) で実施できるオートパッチクランプシステムを用いた hERG (human *Ether-a-go-go* Related Gene) 評価系を整備し、当社既存の標準仕様 (室温/Step pulse 評価: <https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn497.pdf>) と合わせて提供いたします。本稿では、当社での CiPA プロトコールの評価事例を示します。

[背景]

医薬品の候補化合物の催不整脈作用の予測は、新薬の開発成功確度を上げるために非常に重要です。ICH*¹ ガイドライン S7B¹⁾ では、催不整脈作用の原因の一つである QT 間隔延長*² を評価のエンドポイントとし、心筋活動電位の再分極を担うカリウムイオンチャネルである hERG に対する影響を *in vitro* 評価系で明らかにすることが必要とされました。本ガイドラインの制定により、催不整脈を理由に市場から撤退する医薬品はなくなり、QT 延長は催不整脈作用の高感度なサロゲートマーカーとして評価されています。一方で、QT 延長を示す全ての化合物が致死性不整脈 (TdP; Torsades de Pointes) を誘発する訳ではないという課題があり、その改善を目的として米国食品医薬品局を中心とした国際コンソーシアム CiPA (Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay) が発足しました。本コンソーシアムでは、hERG 試験を含む心筋イオンチャネルの評価においてより生体条件に近づけた新規プロトコールが検証され、推奨プロトコールが提案されました (CiPA プロトコール²⁾)。この提案は ICH の文書 (E14/S7B ガイドラインに関する Q&A³⁾) にも記載されました。

- * 1 International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (医薬品規制調和国際会議): 医薬品規制に関するガイドラインを科学的・技術的な観点から作成する国際会議
- * 2 心電図上 QT 時間 (心筋の収縮時間) が延長している状態で、致死性不整脈の発生要因となり得る。

Keywords: 安全性薬理、生理的温度、CiPA pulse、HTS (High throughput screening)、Electrophysiology

[事例]

hERG チャンネル発現細胞 (CHO/ B'SYS) を使い、35.8±1.6°Cの温度管理下で Fig. 1 に示す電圧プロトコールにて hERG 電流を測定しました。被験物質は 1 ウェルに 4 濃度、漸増添加し、最後に hERG 電流を完全に抑制する 100 μM の Quinidine を添加しました (n=8)。阻害活性は被験物質添加前の hERG 電流に対する各濃度添加後の阻害率より IC₅₀ 値を算出することにより評価しました。

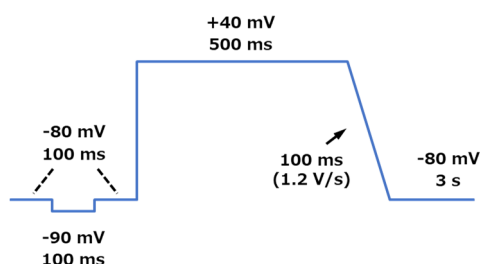


Fig. 1 Recommended voltage protocol under CiPA²⁾

ヒトでTdPを誘発したCisaprideを用いhERG電流への影響を調べた結果をFig.2に示します。Cisaprideの添加により、hERG電流は濃度依存的に抑制されました。また、100 μMのQuinidineを添加することでhERG電流は完全に抑制されたことから、本電圧プロトコルで得られた電流はhERGチャネルを介した電流であること、そして、それ以外のバックグラウンド電流に影響はないことが確認されました。

QT延長やTdPを誘発することが知られている種々薬剤のhERG阻害活性(IC₅₀値)は、当社のオートパッチクランプで取得したデータとCiPAプロトコル準拠のマニュアルパッチクランプで取得された公表データ^{4,5)}と高い正の相関(相関係数:r=0.8633)を示しました(Fig.3)。

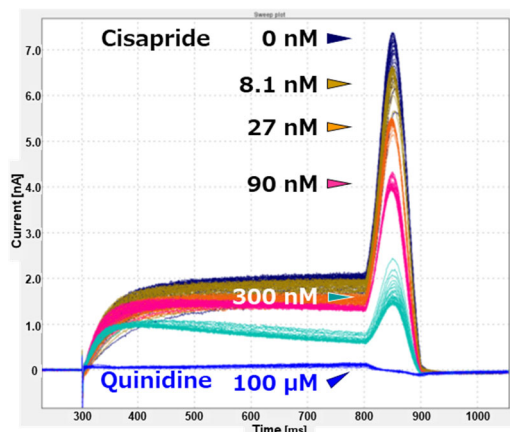


Fig. 2 Typical hERG current waveform; effects of cisapride (8.1– 300 nM)

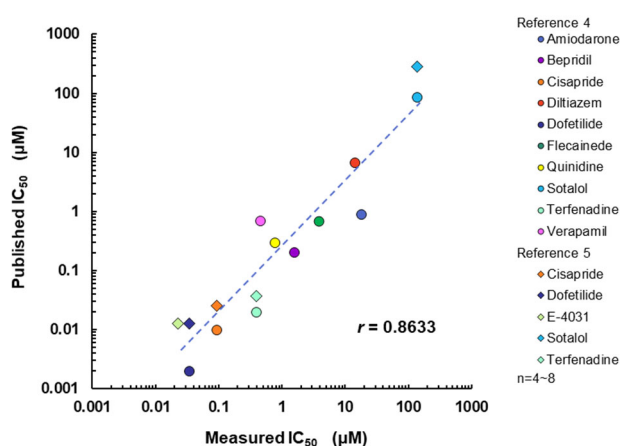


Fig. 3 Comparison on of SCAS data and published data (IC₅₀ values)

以上の結果より、オートパッチクランプシステムを用いて生理的温度条件下において安定したhERG電流の測定ができることを確認し、スクリーニングの段階でレギュレーションに準じた信頼性の高いhERG試験の実施が可能となりました。

[文 献]

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課：薬食審査 発 1023 第 4 号，ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価について”（2009）。
- 2) FDA：“Recommended voltage protocols to study drug-cardiac ion channel interactions using recombinant cell lines”，available from <<https://www.fda.gov/media/151418/download>>, (accessed 2023-9-22).
- 3) ICH E14/S7B Implementation Working Group：“Clinical and Nonclinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Questions and Answers”（2022）。
- 4) W. J. Crumb Jr., J. Vicente, L. Johannesen, D. G. Strauss, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **81**, 251 (2016).
- 5) C. A. Baron, N. Thiebaud, M. Ren, S. Viatchenko-Karpinski, A. Indapurkar, T. King, M. K. Matta, O. A. Ismaiel, V. Patel, M. Mashae, J. Vicente, W. W. Wu, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **117**, 107193 (2022).

[関連技術リンク]

オートパッチクランプシステムを用いた hERG 試験

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn497.pdf>