

Application Report

QPatchを用いたNa_v1.5 (late) 電流 心臓安全性評価試験

標準的なNa_v1.5 (late)薬理学試験の代替法として、QPatchを用いたより正確で信頼性の高いNa_v1.5 (late)試験法を紹介します。この方法はベラトリジンやATX-IIなどの活性化剤を必要としないため、心臓安全性スクリーニング試験の信頼性を向上させ、コストを削減します。

要旨

- QPatchを用いて3型QT延長症候群の変異チャンネルから振幅の小さなNa_v1.5 (late)電流を高精度で記録した。
- 薬理的な活性化剤を用いずにNa_v1.5 (late)電流を安定して記録することで薬物の安全性評価がより高い信頼性で実施可能となった。
- Na_v1.5 (late)電流に作用するNaチャンネル阻害剤性を用いて新たに開発した試験法の薬理的バリデーションを実施した。

序論

心臓における薬物の副作用は創薬プロセスにおいて候補化合物の開発中止の主要な要因であり続けている。このことは、臨床上のリスクを予測するためにはより堅固で安定したin vitro, ex vivo, in vivo試験やモデルが必要であることを示唆している。現在、製薬会社は特に不整脈要因に焦点を合わせたよりバランスが取れた患者リスク評価の新たなイニシアティブを開発することでヒトether-a-go-go遺伝子 (hERG) に関連するカリウムチャンネル (K_v11.1) とQT延長リスク予測に対する過度な依存から脱皮しようとしている。FDAによるComprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) イニシアティブは、非常に高度なヒト心筋活動電位in silicoモデルへ6つのイオンチャンネル (hERG, Ca_v1.2, Na_v1.5 (Peak, late), Kir2.1, K_vLQT1, K_v4.3) データを取り込むことで、より正確な心筋活動電位モデリングと不整脈リスクの予測を行うことを目指している。最近FDAはこの6つのイオンチャンネルの中でも、ある特定のチャンネル電流がその他のチャンネルよりこのモデルへより大きな影響を与えることを示した。hCa_v1.2, Na_v1.5 (late), hERG電流をこのモデルからそれぞれ削除すると、平均予想誤差がそれぞれおよそ0.25, 0.38, 0.75へと増加した (Chang et al., 2017)。

Na_v1.5 (late)電流 (これは持続電流としても知られている) の振幅は小さく、成人の心筋活動電位発生時のような長期の脱分極の間にチャンネル開口がバーストして生じるNa_v1.5 peak電流振幅と比較して1%以下である (Chandra et al., 2018)。通常Na_v1.5 (late)電流は振幅が小さいため、Na_v1.5を発現した遺伝子組み換え細胞から電流記録を行うことは著しく困難とされる。この問題に対する一般的な解決策として、

ベラトリジンやATX-IIといったNa_v1.5 (late)電流賦活剤を用いることがある。しかしこれらの賦活剤はそれぞれ結合部位や賦活化機構、また電流賦活の程度も異なるため、Na_v1.5 (late)電流に作用する既知の化合物の抑制率は大きくばらついてしまう。例えば、ベラトリジン存在下におけるラノラジンのIC50値は90.8 μMだがATX-IIを用いた場合は5.4 μMとなる (Fisher et al., 2018)。ベラトリジンとATX-IIのどちらも内在性Na_v1.xチャンネルへ非選択的に作用することで電流増強作用を示す。これらのチャンネルはCHO細胞およびHEK細胞に存在することが知られており (West et al., 1992; Lalik et al., 1993; He and Soderlund, 2010)、これらの賦活剤によるNa_v1.5 (late)電流誘導の薬理作用の特異性は限定的である

Na_v1.5 (late)電流振幅の小ささ、そしてこれを神経毒由来の薬物を用いて増強することで生じるデータのばらつき、賦活剤のチャンネルに対する非選択性、および費用の問題を克服するため、我々はNa_v1.5チャンネル3型QT延長症候群KQP遺伝子欠損変異体を用いたNa_v1.5 (late)細胞株を作製した。

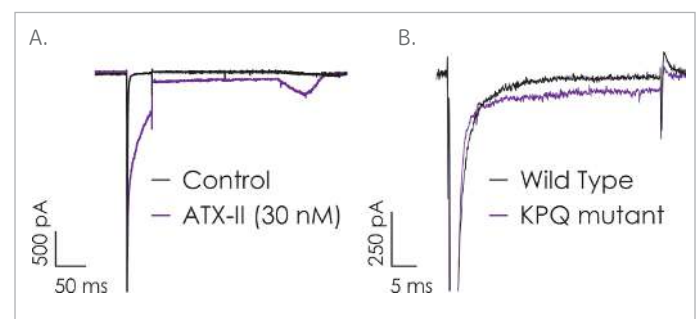


Fig. 1: ATX-IIによるNa_v1.5 (late)電流の賦活 A) ATX-II添加 (30 nM) は野生型Na_v1.5チャンネル電流の不活性化を阻害し、オートパッチによるスクリーニングに適した持続電流を誘導する。 B) 同実験条件におけるNa_v1.5チャンネルΔKQP変異型と野生型における力学的違いを見るため、QPatch細胞クローン機能を用い同一QPlate上で比較を行った。ΔKQP変異型においては早い不活性化の増大を示す一方、Na_v1.5 (late)が持続する間における遅い不活性化を減少させた Spencer, 2009。

結果および考察

HEK 対 CHO Na_v1.5 (late)細胞株

内因性および外因性の電流発現比較を行うため、ΔKPQ Na_v1.5遺伝子をHEK細胞およびCHO細胞に発現させたポリクローナル細胞群を作製した。CHO強制発現細胞では標準的な細胞培養環境下で無視できるほどの内向きピーク電流が認められる程度の最低限の発現を示し、低温の事前培養実施後においてもNa_v1.5内向きピーク電流は-2.0 nA未満であった (Fig. 2)。これに対してHEK強制発現細胞では-5.0 nA以上の大きな内向きナトリウム電流が観察された。そこでこのHEK細胞を以降のQPatchを用いたNa_v1.5 (late)電流試験系の構築に用いた。

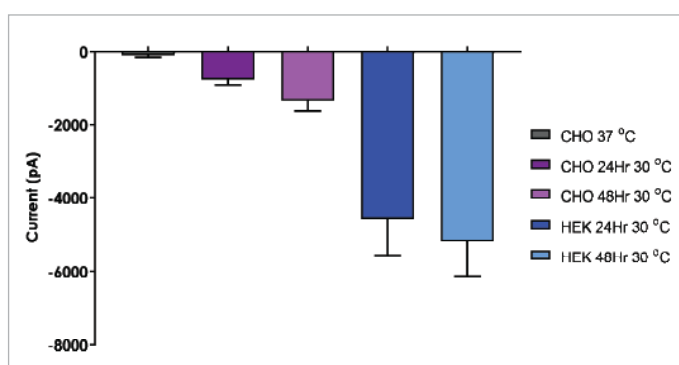


Fig. 2: CHO細胞とHEK細胞におけるNa_v1.5 ΔKPQ ピーク電流発現の比較
CHO細胞ではlate電流解析に十分な振幅の内向きピーク電流は観察されなかった (紫色棒)。一方HEK細胞においては強力なLQT3変異型Na_v1.5チャンネルの発現により十分な振幅のNa_v1.5電流が観察された (青色棒)ため、以降のアッセイではこの細胞を用いた。

適切な電位プロトコルの選択

Na_v1.5 (late)電流を誘導するために、CiPAプロトコルや活動電位を模したプロトコル、step-ramp プロトコルを含め多くの電位プロトコルが用いられてきた (Fig. 3)。MetrionではHEK Na_v1.5 ΔKPQ細胞株とQPatchを用いて、これらの電位プロトコルの比較を行った。CiPAのstep-ramp電位プロトコルでは「rampフェーズ」において小さな内向き電流が生じるが、初期の-15 mVへの脱分極後に持続電流が発生することが確認された。心筋活動電位を模した電位プロトコルでは、振幅の大きなピーク電流の後に持続電流が生じ、この持続電流が「再分極フェーズ」において増大していくことが確認された。最後にシンプルなstep-rampプロトコルを試験し、薬物評価のバリデーション試験用に安定したNa_v1.5 (late)試験系を確立するためにこの試験のさらなる最適化を実施した。

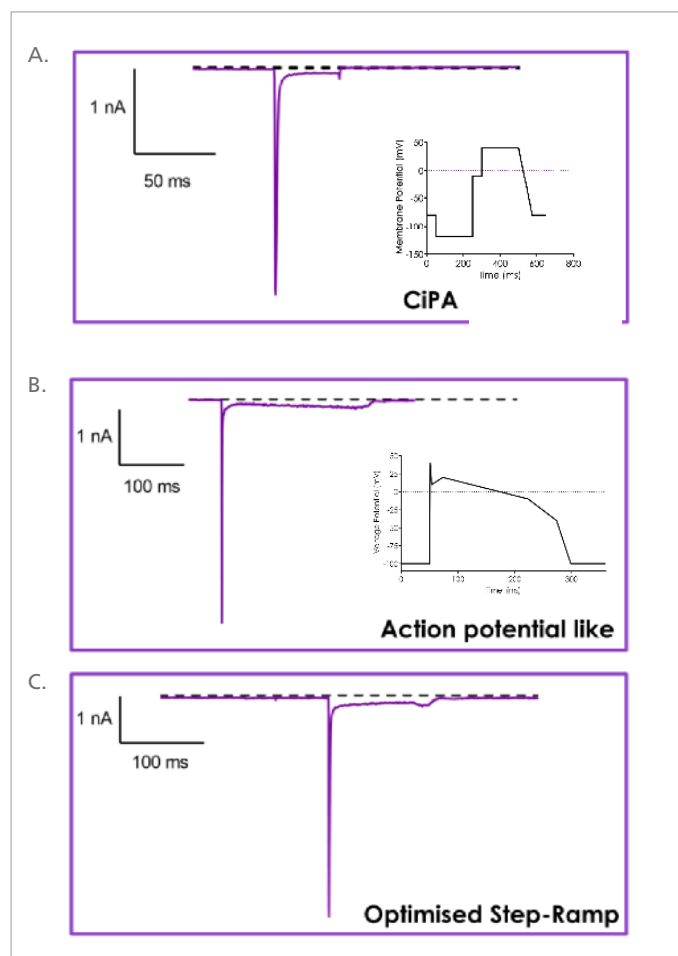


Fig.3: Na_v1.5 ΔKPQにおける様々な電位プロトコルの比較検証
CiPAイオンチャンネルワーキンググループ (ICWG) による電位プロトコル (A) を基準とし、活動電位を模した電位プロトコル (B)、そしてstep-ramp電位プロトコル (C) を比較した。step電位とramp速度を最適化することで、振幅の大きいNa_v1.5 (late)電流を安定して誘導することができた。

Na_v1.5 ΔKPQ試験の薬理的バリデーション

Metrionでは最適化したstep-ramp電位プロトコルを用い、2種類の既知のNa_v1.5 (late)電流阻害剤を用いてNa_v1.5 (late)細胞株のアッセイについてバリデーションを実施した。メキシレチンおよびラノラジンはともにpeak電流よりもlate電流を抑制した (Fig. 4)。長い脱分極刺激中もしくはrampコマンド中における持続電流を測定したとき、各化合物のNa_v1.5 (late)電流に対する作用はほとんど変わらなかった (Fig. 4)。

結論

不整脈リスクを予測するin silicoモデルをサポートする正確な心臓安全性試験データを提供するためには、信頼性が高く、安価で、正確な $\text{Na}_v1.5$ (late)電流アッセイをオートパッチで実施する必要がある。ペラトリジンやATX-IIといった非選択的な賦活剤を用いた $\text{Na}_v1.5$ (late)アッセイでは不正確なIC50値やばらつきの大きい結果しか得られない。さらにはATX-IIIは非常に高価である。我々は病態生理学的手法により作製した ΔKPQ LQT3遺伝子組み換え細胞を用いて、薬理学的な活性化剤を必要としない $\text{Na}_v1.5$ (late)試験系を確立しバリデーションを行った。これによって心臓安全性スクリーニング試験の信頼性とコストを改善することができた。

方法

ATCC/ECACC より入手したCHO細胞およびHEK細胞に対し、検証済みのヒトLQT3変異型 $\text{Na}_v1.5$ ΔKPQ 配列を含むベクターをリポソーム法により遺伝子導入を行った。細胞の培養と調製はMettrionにてQPatch用に最適化したプロトコルを用いて行った。標準的なQPatch用の細胞の懸濁手順、シール形成およびホールセルプロトコルを用い、より良好なギガオームシールと実験に適したNa電流を得るために一部改変を加えた。

References:

- Chandra, R. *et al.* (2018) 'Multiple effects of KPQ deletion mutation on gating of human cardiac Na^+ channels expressed in mammalian cells', *Am J Physiology* 274, pp. 1643–1654. PMID: 9612375
- Chang, K. C. *et al.* (2017) 'Uncertainty Quantification Reveals the Importance of Data Variability and Experimental Design Considerations for in Silico Proarrhythmia Risk Assessment', *Frontiers in Physiology*, 8, p. 917. PMID: 29209226.
- Fisher, J. *et al.* (2018) 'Potency of Late- $\text{Na}_v1.5$ Current Inhibition Depends on the Agonist Used to Augment It', *SPS* 2018. <https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/SP-SPS-18-potency-of-late-Nav1.5-current-inhibition-depends-on-the-agonist-used-to-augment-it.pdf>
- He and Soderlund (2010) 'Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and $\text{Nav}1.7$ sodium channels', *Neuroscience Letters*, 469, 268–272. PMID: 20006571.
- Lalik *et al.*, (1993), 'Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells', *Am J Physiology* 264, pC803–809. PMID: 7682773.
- Spencer, C. I. (2009) 'Actions of ATX-II and other gating-modifiers on Na^+ currents in HEK-293 cells expressing WT and KPQ h $\text{Na}_v1.5$ Na channels', *Toxicol*, 53, pp. 78–89. PMID: 18996139.
- West *et al.*, (1992), 'Efficient expression of rat brain type IIA Na^+ channel alpha subunits in a somatic cell line', *Neuron* 8, p59–70. PMID: 1309650.

Author: Edward S A Humphries, Mettrion Biosciences Ltd.

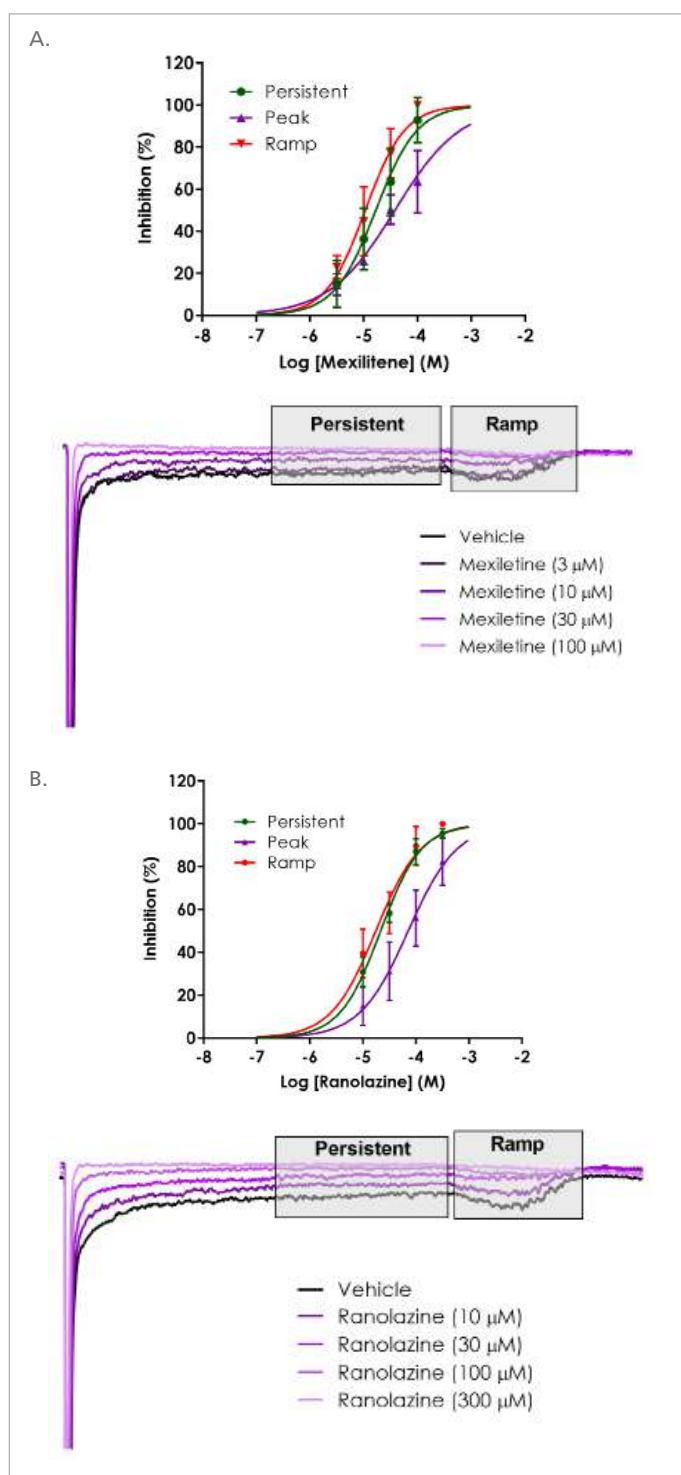


Fig. 4: 既知のNaチャンネル阻害剤を用いた $\text{Na}_v1.5$ (late)アッセイのバリデーション
 A) メキシレチンはpeak電流 (38.0 μM) に比べてlate電流 (ramp = 10.7 μM , persistent = 16.8 μM) をより抑制する傾向が認められた。
 B) ラノラジンではpeak電流 (71.7 μM) に比べてさらにlate電流 (ramp = 17.6 μM , persistent = 21.7 μM) をより抑制する傾向が認められた。