

# ハイスループット自動パッチクランプシステムの進展: 安全性薬理試験への応用

nanji[on]

○嶋根 三好<sup>1)</sup>、岡 貴之<sup>1)</sup>、大槻 篤史<sup>1)</sup>、松浦 勝久<sup>2)</sup>、原口 裕次<sup>2)</sup>、清水 達也<sup>2)</sup>

1) ナニオン テクノロジーズ ジャパン株式会社 info@nanion.jp  
2) 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

## 緒 言

2002年に創薬向け自動パッチクランプシステムが上市されてから今日に至るまで、本システムはイオンチャンネルを標的とするライブラリスクリーニングならびに安全性薬理試験に大きく貢献している。その機能は主にユーザーの需要に沿って開発が行われ、近年では Comprehensive in vitro Proarrhythmic Assay (CIPA) イニシアチブの議論を受けて、生理的条件下での測定が可能なシステムが求められている。本研究では、384ウェル同時測定ハイスループット自動パッチクランプシステム SyncroPatch 384PE を用いて心筋イオンチャンネル (Cav1.2(Ica), Kv4.3(ITO), Kir2.1(IK1), Kir3.1/Kir3.4(IKACH) チャンネル) の測定を行うとともに、生理的温度での測定が可能となった温度調節機能、ならびに iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位記録 (Current clamp モード) についてデータを示す。

## 方 法

測定システム:  
SyncroPatch 384PE (Nanion Technologies 社: 図1)

細胞:  
Cav1.2-CHO, Kv4.3-CHO, Kir2.1-HEK, Kir3.1/Kir3.4-HEK 細胞 (CT6004, CT6171, CT6103, CT6017: Charles River 社)

細胞培養ならびに細胞調製:  
Nanion's Standard Procedure に従って行った

細胞内液 (mM):  
Cav1.2: 140 CsF, 10 NaCl, 1 EGTA, 10 Hepes, pH 7.2 (CsOH)  
Kv4.3, Kir2.1, Kir3.1/Kir3.4: 120 KF, 10 NaCl, 20 KCl, 5 EGTA, 10 Hepes, pH 7.2 (KOH)  
細胞外液 (mM):  
135 NaCl, 4 KCl, 2/5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 D-Glucose, 10 Hepes, pH 7.4 (NaOH)



図1. SyncroPatch 384PE

## 心筋イオンチャンネルの測定

### Cav1.2 (Ica)

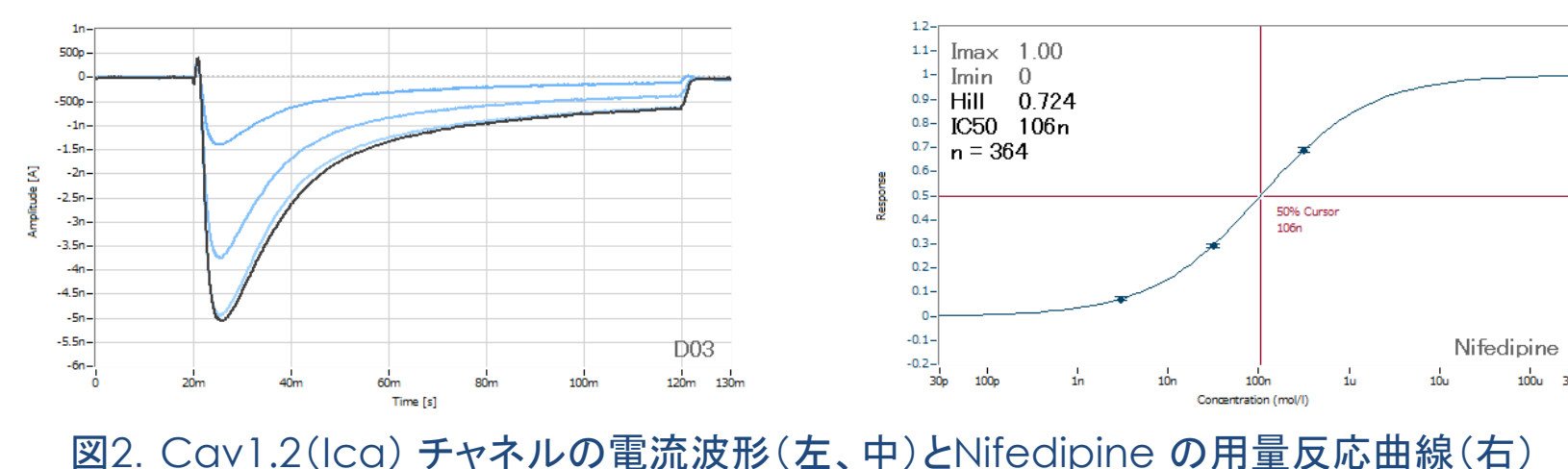
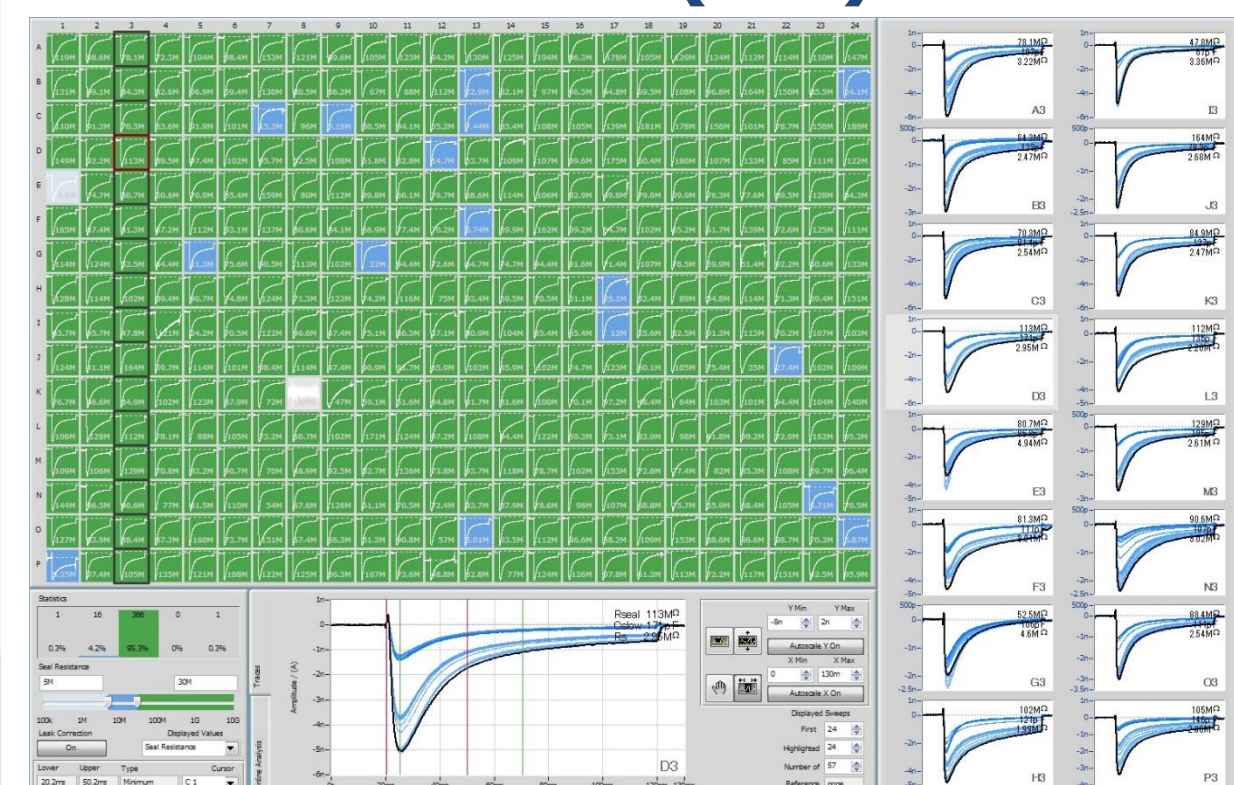


図2. Cav1.2(Ica) チャンネルの電流波形 (左、中) と Nifedipine の用量反応曲線 (右)

| Chip    | Patch clamp config.      | IC <sub>50</sub>                                     | Success rate (%) |
|---------|--------------------------|------------------------------------------------------|------------------|
| 4 holes | Perforated (25 μM Escin) | Nifedipine 106 nM (Literature 100 nM <sup>1)</sup> ) | 94.7 (n=364)     |

表1. Cav1.2(Ica) チャンネルの測定条件と Nifedipine の IC<sub>50</sub> ならびに実験成功率

### Kv4.3 (ITO)

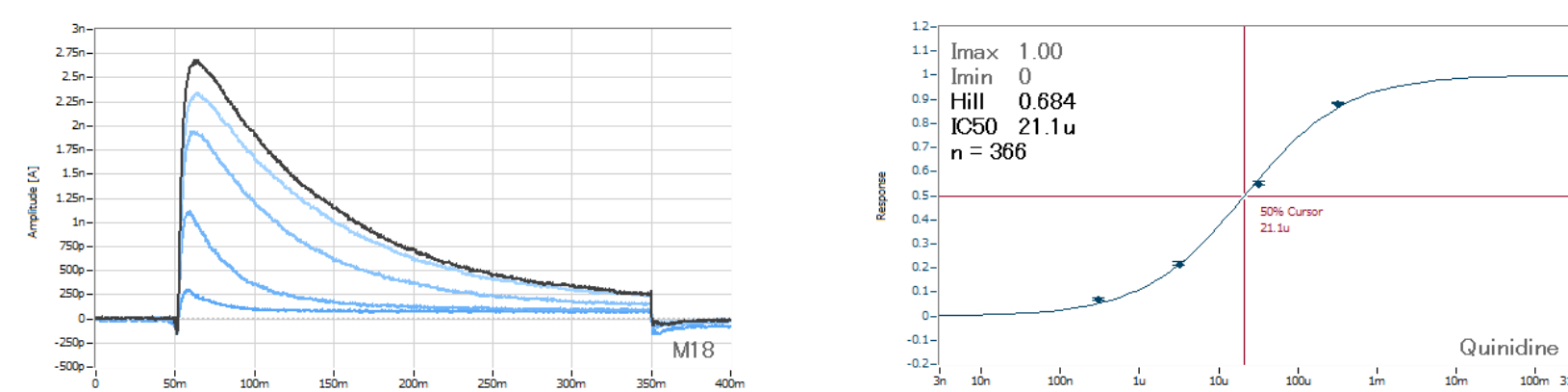
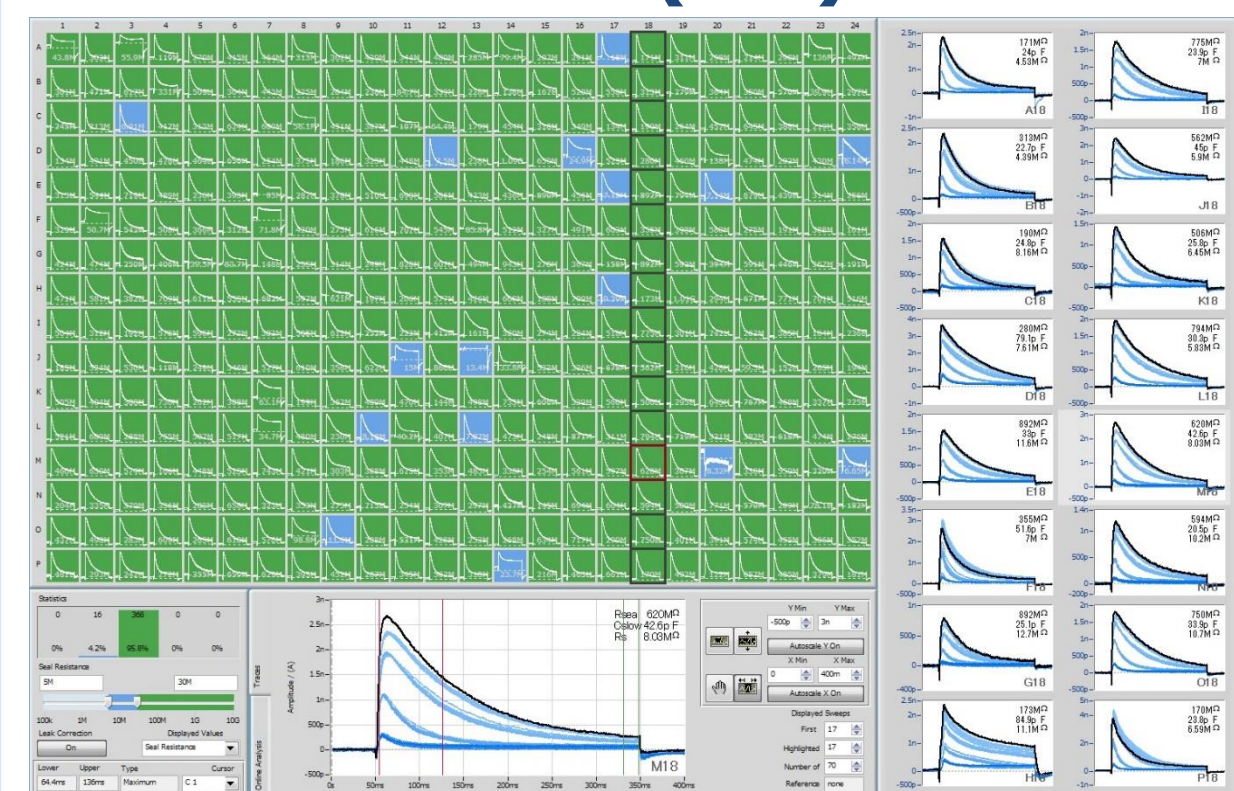


図3. Kv4.3(ITO) チャンネルの電流波形 (左、中) と Quinidine の用量反応曲線 (右)

| Chip    | Patch clamp config. | IC <sub>50</sub>                                      | Success rate (%) |
|---------|---------------------|-------------------------------------------------------|------------------|
| 4 holes | Whole-cell          | Quinidine 21.2 μM (Literature 79.3 μM <sup>2)</sup> ) | 95.3 (n=366)     |

表2. Kv4.3(ITO) チャンネルの測定条件と Quinidine の IC<sub>50</sub> ならびに実験成功率

### Kir2.1 (IK1)

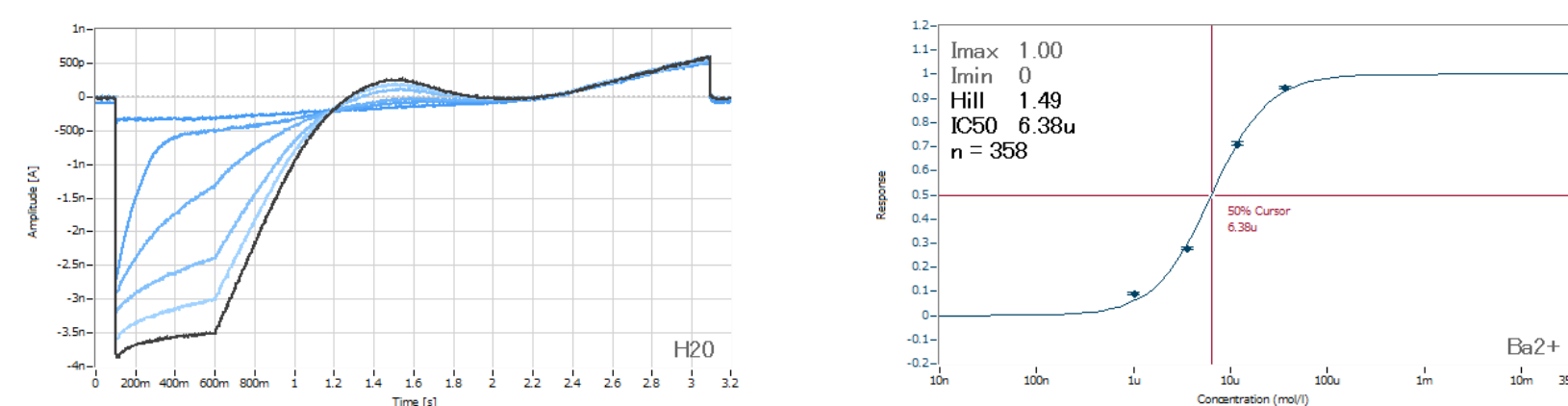
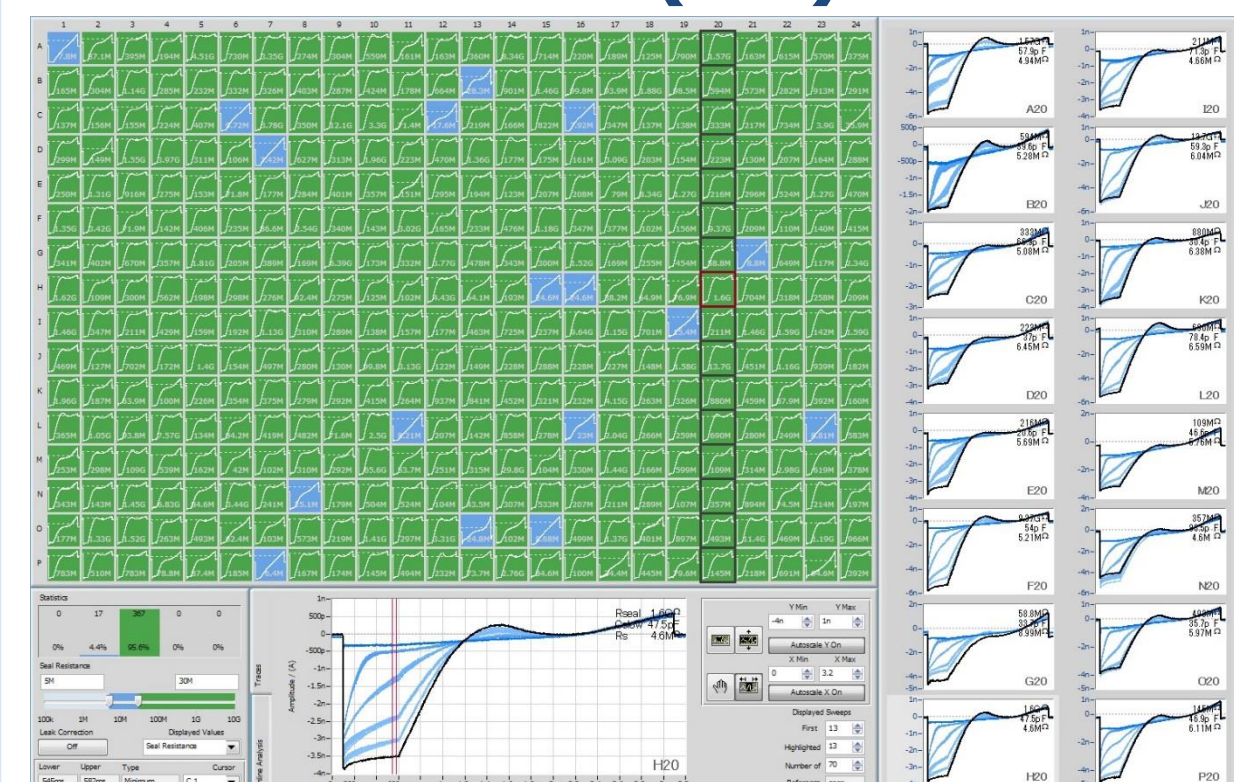


図4. Kir2.1(IK1) チャンネルの電流波形 (左、中) と Ba<sup>2+</sup> の用量反応曲線 (右)

| Chip    | Patch clamp config. | IC <sub>50</sub>                                             | Success rate (%) |
|---------|---------------------|--------------------------------------------------------------|------------------|
| 4 holes | Whole-cell          | Ba <sup>2+</sup> 6.38 μM (Literature 16.2 μM <sup>3)</sup> ) | 93.2 (n=358)     |

表3. Kir2.1(IK1) チャンネルの測定条件と Ba<sup>2+</sup> の IC<sub>50</sub> ならびに実験成功率

### Kir3.1/Kir3.4 (IKACH)

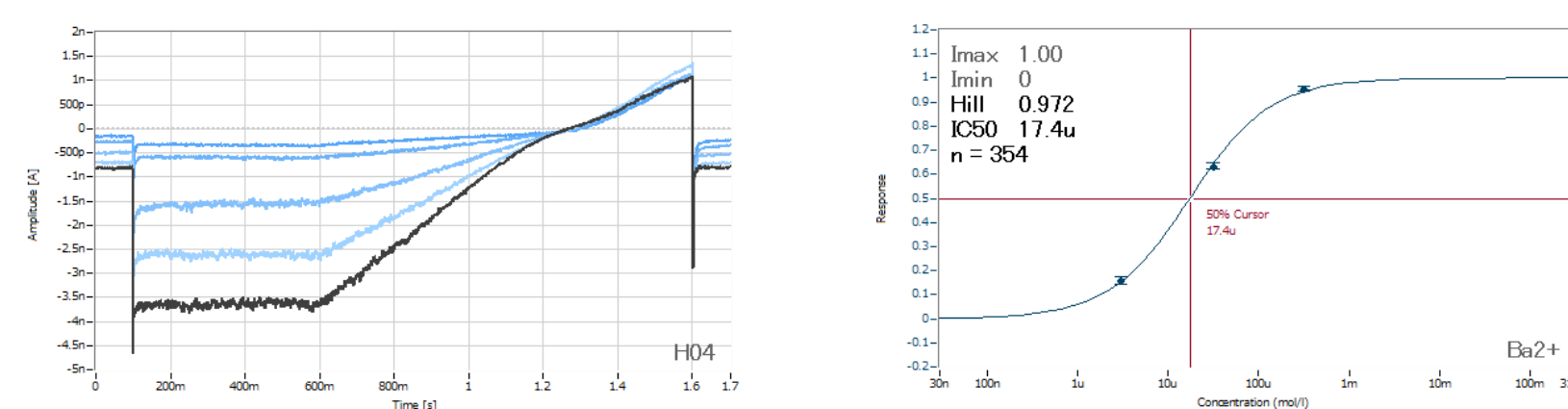
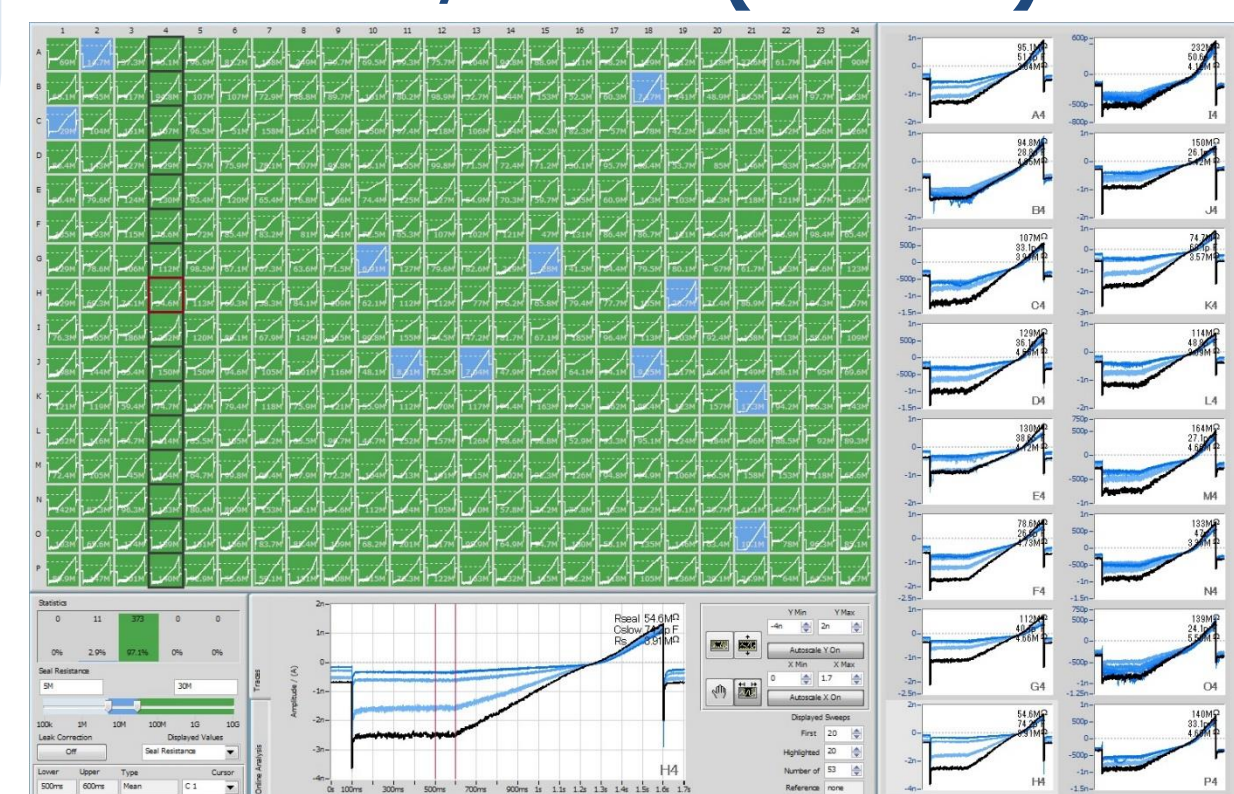


図5. Kir3.1/Kir3.4(IKACH) チャンネルの電流波形 (左、中) と Ba<sup>2+</sup> の用量反応曲線 (右)

| Chip   | Patch clamp config.      | IC <sub>50</sub>                                            | Success rate (%) |
|--------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------|
| 1 hole | Perforated (25 μM Escin) | Ba <sup>2+</sup> 17.4 μM (Literature 6.8 μM <sup>4)</sup> ) | 92.1 (n=354)     |

表4. Kir3.1/Kir3.4(IKACH) チャンネルの測定条件と Ba<sup>2+</sup> の IC<sub>50</sub> ならびに実験成功率

全ての実験で化合物を全ウェルに累積で添加して用量反応曲線を作成し、IC<sub>50</sub> を算出した。その値は文献値とよく一致し、実験成功率は90 % 以上だった。

<sup>\*1</sup>. Liao et al. J Biol Chem. 2007, 282 (48), 35133-42. <sup>\*2</sup>. Crumb et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2016, 81, 251-62.  
<sup>\*3</sup>. Schram et al. Cardiovasc Res. 2003, 59 (2), 328-38. <sup>\*4</sup>. hKir3.1/Kir3.4-HEK Data Sheet, Charles River

## 生理的温度 (35℃) での hERG チャンネル測定

CIPA

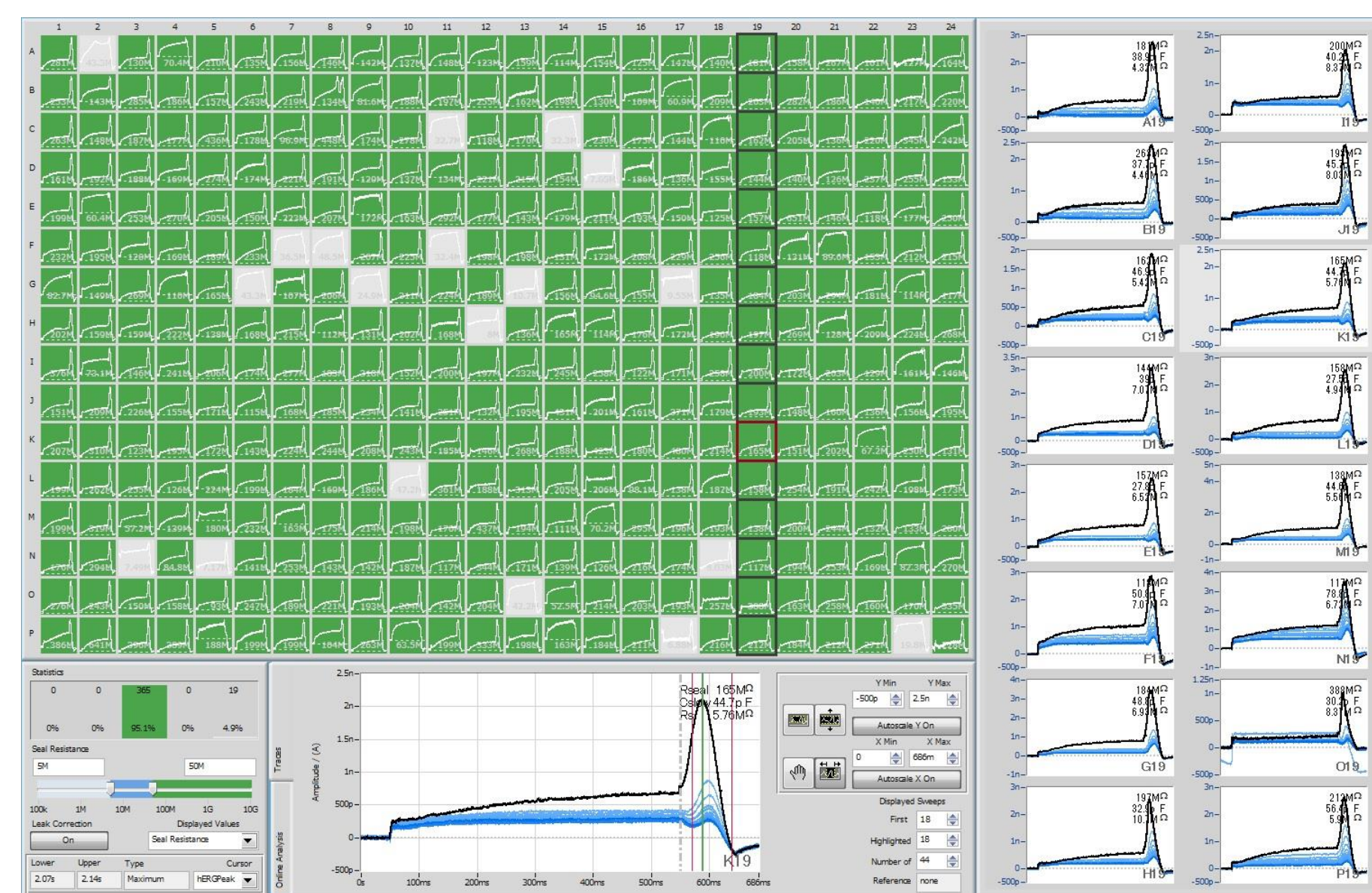


図7. 35℃での hERG チャンネル測定 (上) と Erythromycin の用量反応曲線 (右)

| Chip    | Patch clamp config. | IC <sub>50</sub>                                        | Success rate (%) |
|---------|---------------------|---------------------------------------------------------|------------------|
| 4 holes | Whole-cell          | Erythromycin 60.5 μM (Literature 115 μM <sup>5)</sup> ) | 94.7 (n=364)     |

表5. 35℃での hERG チャンネル測定条件と Erythromycin の IC<sub>50</sub> ならびに実験成功率

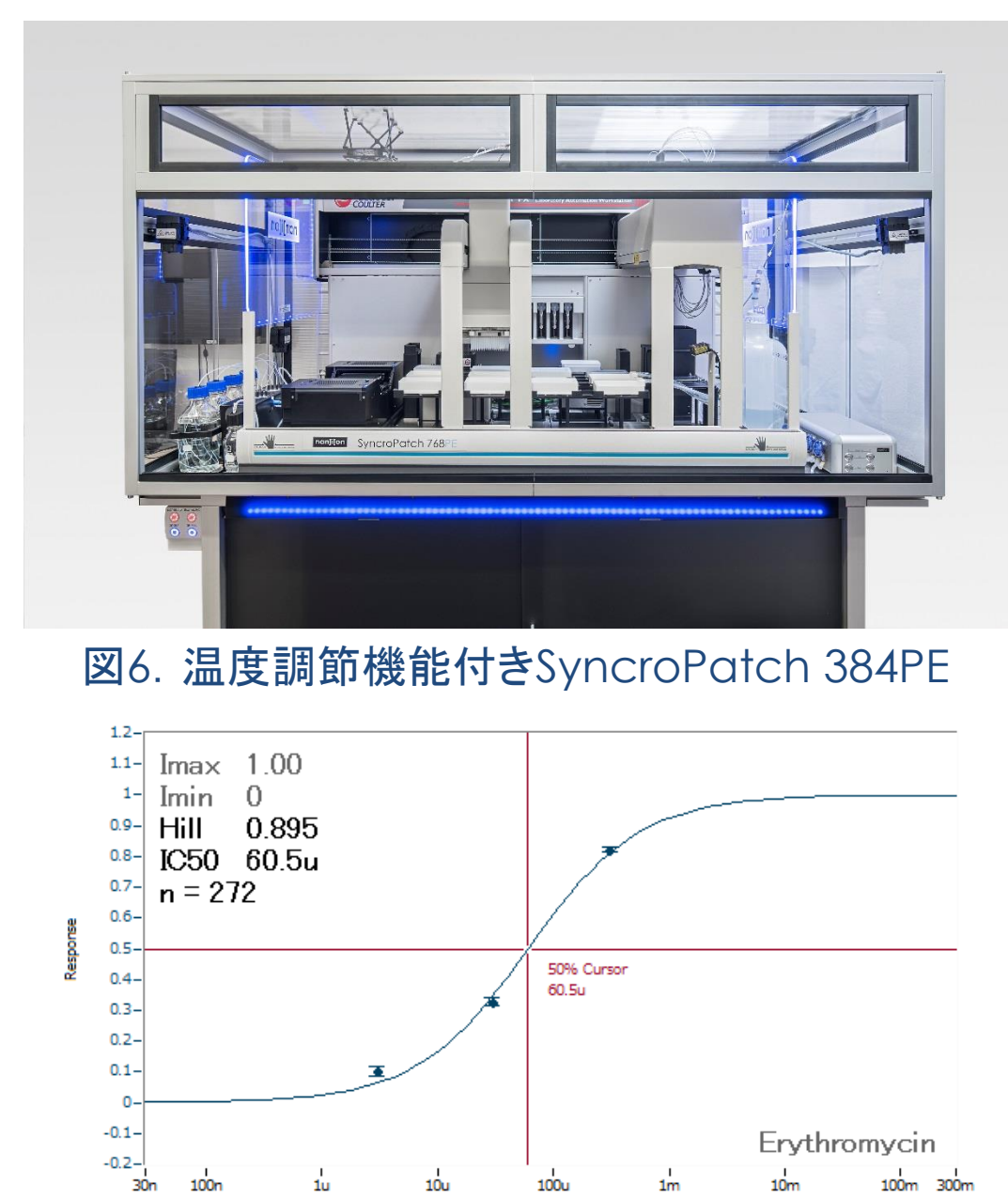


図6. 温度調節機能付き SyncroPatch 384PE

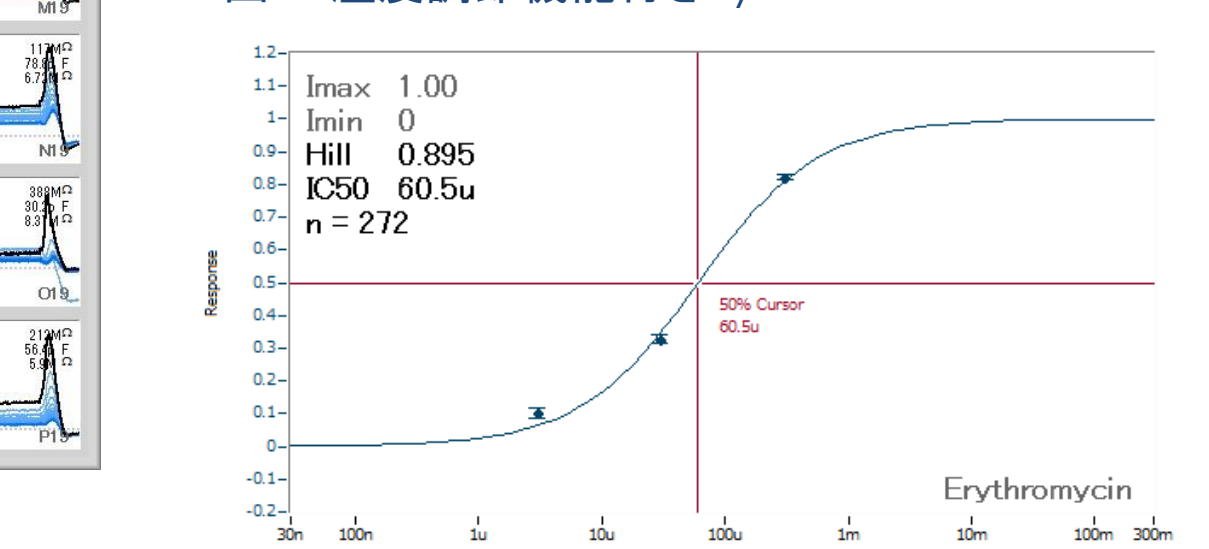


表6. Erythromycin の IC<sub>50</sub> と測定温度

SyncroPatch 384PE はシステム全体をケージで囲って温度調節を行うため、測定部分のみならず溶液やピペットチップ等を含めたシステム全体の温度管理が可能となり、より精密な温度調節が可能となっている (図6)。本実験ではシステムを生理的温度 (35℃) に設定して hERG チャンネルの測定を行った (図7)。Erythromycin の用量反応曲線を作成して IC<sub>50</sub> を算出したところ、60.5 μM であった (表5)。室温 (25℃) では 598 μM となり、約10倍の差が見られた。(表6)

<sup>\*5</sup>. Kirsch et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2004, 50 (2), 93-101.

## iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位記録 (Current clamp モード)

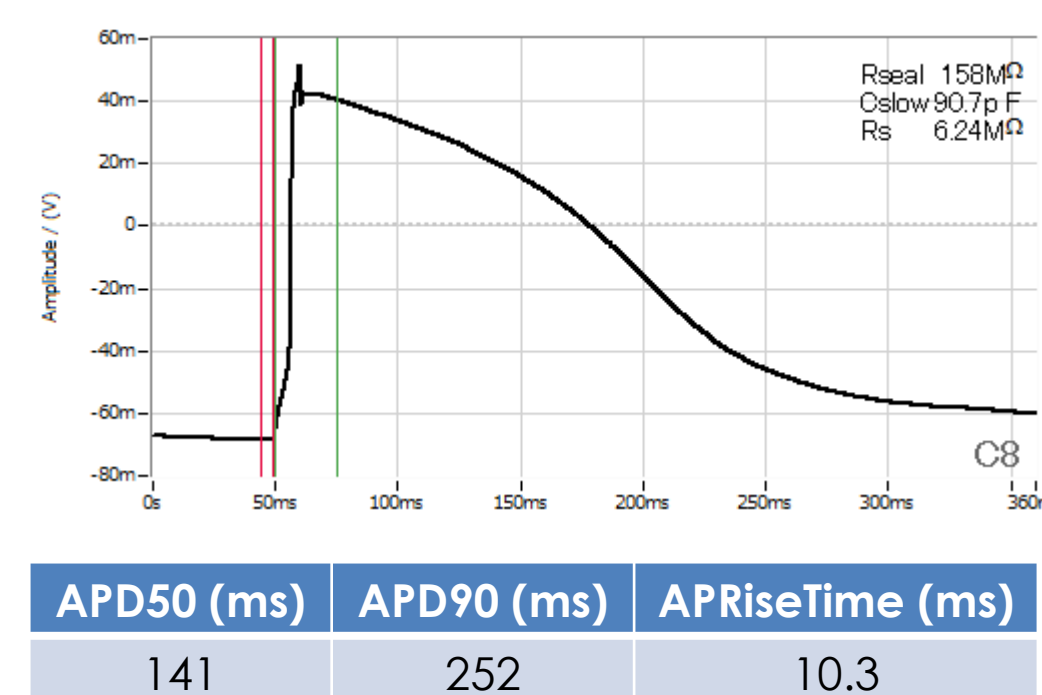


表7. iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位 (左) の APD50, APD90 ならびに APriseTime

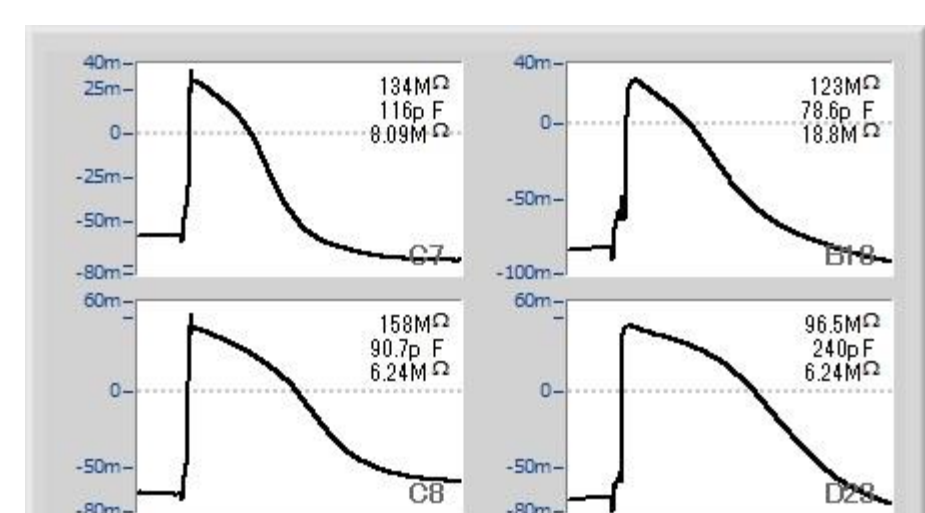


図8. iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位 (左、右)

東京女子医科大学先端生命医科学研究所から提供された iPS 細胞由来心筋細胞<sup>\*6-7</sup>を剥離・調製し、Current clamp モードで活動電位を記録した (図8)。APD50 等の解析は SyncroPatch 384PE 専用解析ソフトウェア DataControl384 を用いて行った。(表7)

<sup>\*6</sup>. Matsuura et al. Biochem Biophys Res Commun. 2012, 425 (2), 321-7.

<sup>\*7</sup>. Matsuura et al. Sci Rep. 2016, 6, 21747.

TWINs

## 細胞内液置換機能

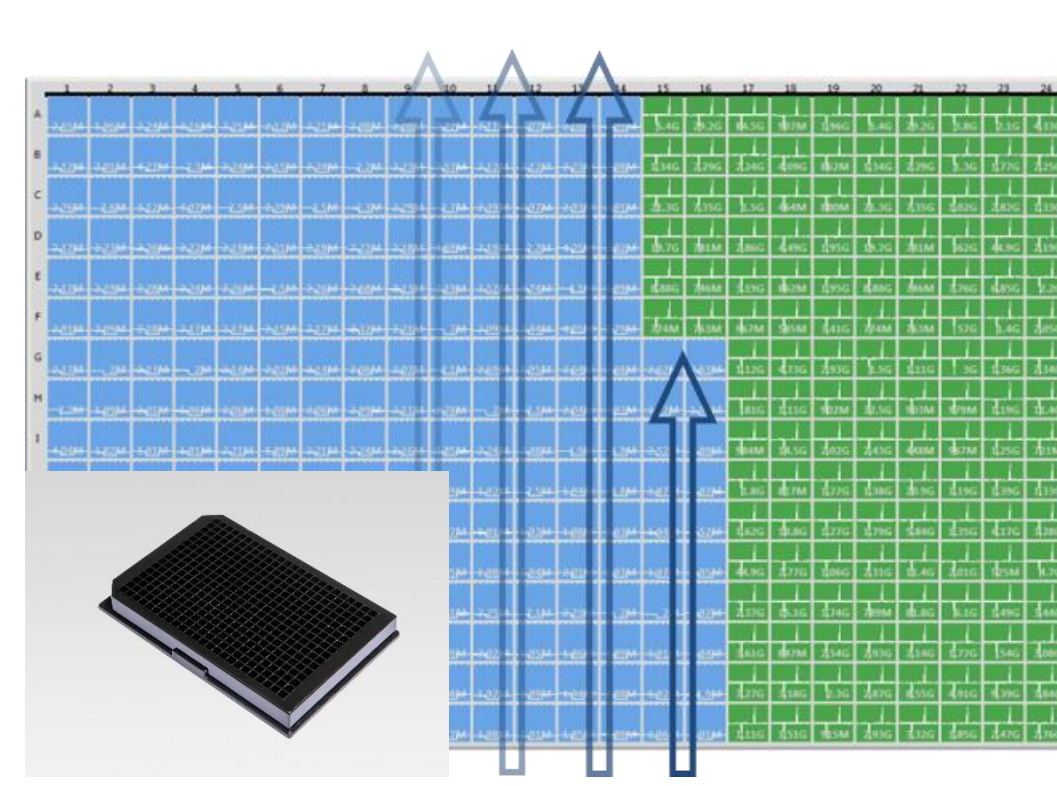


図9. 細胞内液置換機能のイメージ

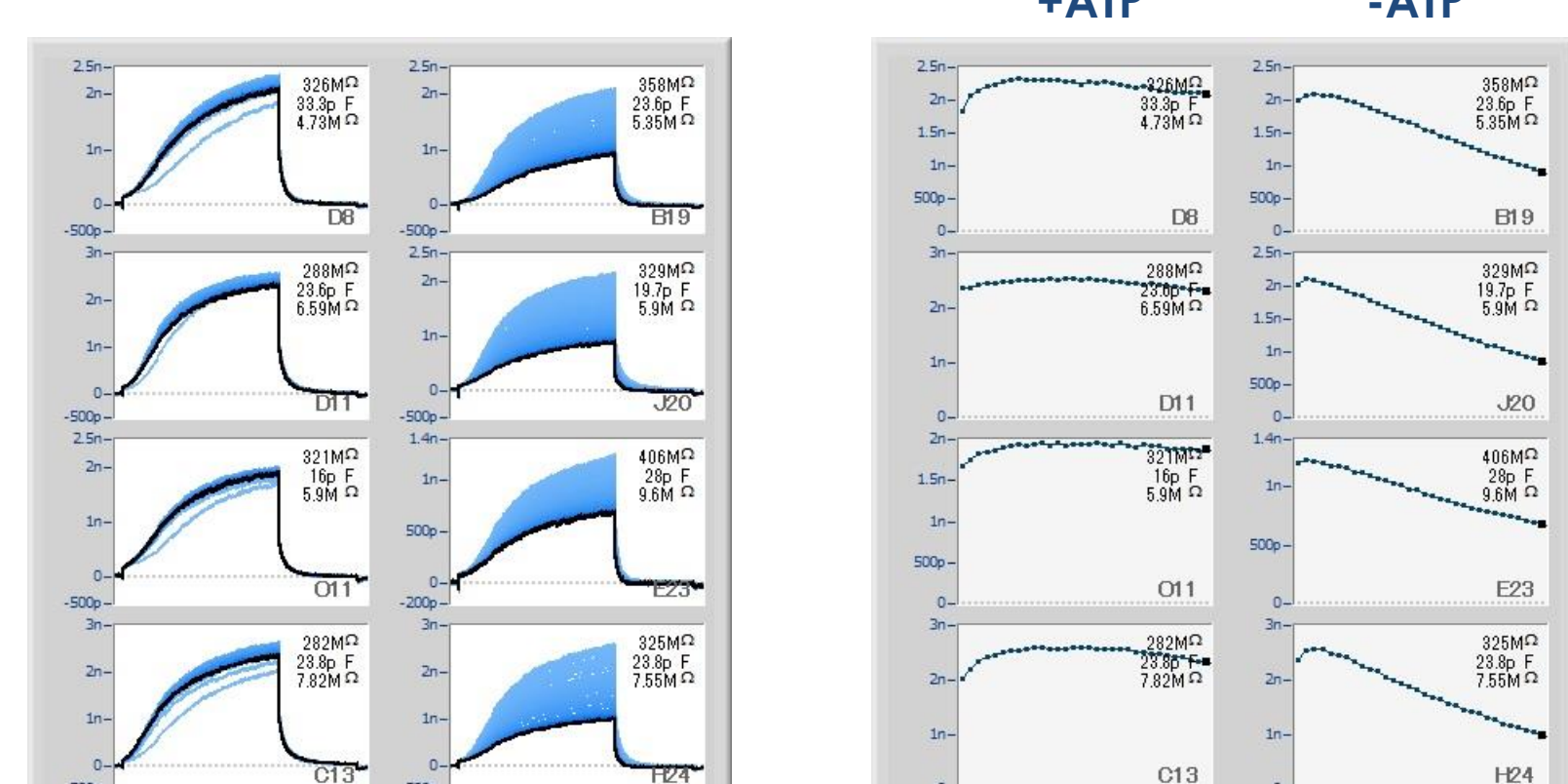


図10. Kv7.1/KCNE1 (IKs) チャンネルの電流波形 (左) と電流値の経時変化 (右)

SyncroPatch 384PE は、測定チップ底面側の溶液 (細胞内液) を測定中にいつでも列単位で他の溶液に置換することが可能である (図9)。本機能を使用して、Kv7.1/KCNE1 (IKs) チャンネル測定時に細胞内液を ATP を含む溶液と含まない溶液に置換して、電流値に変化が見られるか検討した。ATP を含む溶液に置換した列は電流値の変化は見られなかったが、含まない溶液に置換した列は顕著に電流値のrundown が見られた。(図10: 溶液を置換してから3分間電流値を記録し (右)、黒色の電流波形は溶液を置換してから3分後の波形を示している (左))

## 結 論

- SyncroPatch 384PE を用いて、心筋イオンチャンネル (Cav1.2(Ica), Kv4.3(ITO), Kir2.1(IK1), Kir3.1/Kir3.4(IKACH) チャンネル) を90 % 以上の実験成功率で測定することができた
- 温度調節機能によって、生理的温度 (35℃) での hERG チャンネル測定が可能になり、測定温度による IC<sub>50</sub> の差が確認できた
- Current clamp モードによって、iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位が記録できた
- 細胞内液置換機能によって、Kv7.1/KCNE1 (IKs) チャンネル測定において細胞内液の ATP が電流値のrundown を防ぐことが確認できた