電位依存性イオンチャネル探索研究における蛍光および電気生理学的高速スクリーニング(HTS)法

澤田 光平, 日原 裕恵, 吉永 貴志

要約: オンチャネルは生理的に重要な機能を有しており, 創薬の標的としても非常に魅力がある. しかしイオンチャネル創薬研究は他の分野に比べ未開拓であり, その中でも電位依存性イオンチャネルは研究の難しさから特に遅れている. 電位依存性イオンチャネルの創薬研究でも 1 次スクリーニングには蛍光測定法のような多検体評価の可能な系, 2 次スクリーニングはより信頼性が高く, 生理的条件で情報の得られるパッチクランプ法を用いることが推奨される. しかし, 従来のパッチクランプ法では熟練した研究員でも 1 日に多くて 10 化合物程度しか評価できず, スループット性は低い. このために電位依存性イオンチャネルの創薬研究の発展は著しく阻害されていた. しかし, 最近オートメーションパッチクランプ法が開発され, 電位依存性イオンチャネルの創薬研究も新たに活況を呈するようになってきた. hERG チャネルは薬剤による QT 延長, 不整脈誘発の危険性に最も深くかかわっており, 探索研究初期からそのリスク排除のための検討が必要である. 我々は化合物による hERG チャネル抑制作用検討のため, hERG チャネル安定発現細胞の樹立, 高速スクリーニング法として蛍光膜電位測定法, また 2 次スクリーニング法として IonWorks HT システムを用いたオートメーションパッチクランプ法の構築を試みた. 蛍光膜電位測定法は非常に高いスループット性を有するが, false negative/positive の割合も高い. 一方 IonWorks HT を用いたオートメーションパッチクランプは従来のパッチクランプと比較しても同等の精度で電流の記録が可能であり, 化合物の IC₅₀ 値もよい相関を示した. しかし一部の化合物では IC₅₀ 値の乖離も見られ, 今後更にシステムの改良も必要である.

以上のように電位依存性イオンチャネル創薬技術にはまだ課題もあるが, 大きな可能性が開けてきた.

1. はじめに

最近のバイオテクノロジーやハイスループットアッセイ技術の進歩は創薬研究に大きな変革をもたらした. この中であってイオンチャネルをターゲットとした創薬研究, 特に電位依存性イオンチャネルの場合はなかなかこの流れに乗ることができなかった. 電位依存性イオンチャネルの開閉は膜電位により制御されているために, その機能評価にはパッチクランプ法などの電気生理技術を必要とする. マンパワーに依存する従来のパッチクランプ法では多検体の化合物評価は困難であり, この点が電位依存性イオンチャネルの創薬研究の大きな障害となっていた. しかし, ここ数年, 多検体評価が可能な蛍光膜電位測定法, イオンフラックス測定法, また更にはオートメーションパッチクランプ法技術が目覚しく進歩し(1-4), 電位依存性イオンチャネルをターゲットとした創薬も再び活況を呈するようになりつつある.

2. 創薬ターゲットとしての電位依存性イオンチャネル

電位依存性イオンチャネルはほとんどすべての細胞で細胞膜を介したイオンの出入りを制御し, 神経では興奮の発生, 伝導, 神経伝達物質の遊離, 筋肉では収縮の制御, 分泌細胞ではホルモン等の遊離と生命活動に必須の役割を果している. イオンチャネルはイオンに対する選択性から Na⁺, Ca²⁺, K⁺ および Cl⁻ チャネルの 4 つに大別され, それぞれのチャネルが更に多

キーワード: 電位依存性イオンチャネル, 蛍光膜電位測定法, オートメーションパッチクランプ, hERG チャネル, 創薬
エーザイ(株) 創薬第一研究所 (〒300-2635 茨城県つくば市東光台 5-1-3)
e-mail: k-sawada@hhc.eisai.co.jp

原稿受領日: 2005 年 7 月 20 日, 会誌編集委員会依頼原稿

Title: Fluorescent and electrophysiological high-throughput screening technologies for exploratory research on voltage-dependent ion channels

Author: Kohei Sawada, Hiroe Hihara, Takashi Yoshinaga

表1 イオンチャネル創薬で標的となっている電位依存性チャネル

Na チャネル	主な分布	機能	対象疾患
Nav1.1 (TypeI)	中枢神経系	活動電位の発生, 反復発火	てんかん
Nav1.2 (TypeII)	中枢神経系	活動電位の発生, 伝導, 反復発火	てんかん
Nav1.3 (TypeIII)	中枢神経系	活動電位の発生, 反復発火	神経因性疼痛
Nav1.4 (SKMI)	骨格筋	活動電位の発生と興奮伝導	?
Nav1.5 (H1)	心筋細胞	活動電位の発生と興奮伝導	不整脈
Nav1.6 (PN4)	中枢, 末梢神経系	活動電位の発生と興奮伝導	てんかん, 疼痛
Nav1.7 (PN1)	末梢神経系	活動電位の発生と興奮伝導	疼痛
Nav1.8 (PN3)	末梢神経系	活動電位の発生	疼痛
Nav1.9 (PN5)	末梢神経系	活動電位の発生	疼痛
Ca チャネル	分布	機能	対象疾患
Cav1.1 (L-type $\alpha 1S$)	骨格筋	興奮-収縮の電位センサー	?
Cav1.2 (L-type $\alpha 1C$)	心筋, 平滑筋, 分泌細胞	筋収縮やホルモン分泌に必要な Ca 流入	循環器疾患
Cav1.3 (L-type $\alpha 1D$)	分泌細胞, 神経	ホルモン遊離, 神経シナプス可塑性	アルツハイマー病
Cav1.4 (L-type $\alpha 1F$)	網膜	神経伝達物質の遊離	?
Cav2.1 (P/Q-type)	中枢, 末梢神経系	神経伝達物質の遊離	?
Cav2.2 (N-type $\alpha 1B$)	中枢, 末梢神経系	神経伝達物質の遊離	疼痛
Cav2.3 (R-type $\alpha 1E$)	中枢, 末梢神経系	神経伝達物質の遊離	疼痛
Cav3.1 (T-type $\alpha 1G$)	神経系, 洞房結節	神経, 心筋活動電位発生	てんかん, 痛み
Cav3.2 (T-type $\alpha 1H$)	腎臓, 肝臓, 平滑筋, 心筋, 分泌細胞, 神経 (DRG)	神経, 心筋活動電位発生, 平滑筋収縮制御	高血圧, てんかん, 疼痛
Cav3.3 (T-type $\alpha 1I$)	中枢神経系	神経, 心筋活動電位発生	てんかん
K チャネル	分布	機能	対象疾患
Kv1.1 (KCNA1)	神経	膜電位の維持, 興奮性の制御	多発性硬化症
Kv1.2 (KCNA2)	神経, 心臓	膜電位の維持, 興奮性の制御	多発性硬化症
Kv1.3 (KCNA3)	T-細胞, 神経	膜電位の制御	自己免疫疾患
Kv1.4 (KCNA4)	心臓, 神経	膜電位の維持, 興奮性の制御	疼痛
Kv1.5 (KCNA5)	心臓他	活動電位再分極	心房細動
Kv2.1 (KCNB1)	神経, 筋肉	膜電位の維持, 興奮性の制御	糖尿病
Kv3.2 (KCNC2)	心臓, 神経	膜電位の維持, 興奮性の制御	てんかん
Kv4.3 (KCND3)	心臓	活動電位再分極	不整脈
Kv7.1 (KCNQ1, LQT1)	心臓	活動電位再分極	不整脈
Kv7.2 (KCNQ2)	神経	膜電位の維持, 興奮性の制御	てんかん, 神経痛, アルツハイマー病
Kv7.3 (KCNQ3)	神経	膜電位の維持, 興奮性の制御	てんかん, 神経痛, アルツハイマー病
Kv7.4 (KCNQ4)	神経	膜電位の維持, 興奮性の制御	尿失禁
Kv7.5 (KCNQ5)	神経, 筋	膜電位の維持, 興奮性の制御	尿失禁
Kv10.1 (EAG1)	神経, 筋	細胞周期の制御	癌
Kv11.1 (hERG)	心臓, 神経	活動電位再分極	不整脈, 癌
Kv12.1 ~ 12.3	神経, 骨格筋	?	?
Cl チャネル	分布	機能	対象疾患
CLC-1 ~ 7	骨格筋, 腎, 破骨細胞	膜電位再分極, タンパク再吸収, 骨器質吸収	?
CLC-Ka, Kb	腎	Cl 輸送	高血圧

くのサブタイプに分類される。表1に創薬のターゲットとして考えられている電位依存性チャネルとその対象疾患についてまとめた。Na⁺チャネルは骨格筋に存在する Nav1.4 以外が創薬のターゲットとして考えられている。既存の抗てんかん薬, 抗不整脈薬あるいは鎮痛薬の中には Na⁺チャネル阻害に基づいて効果を発揮している薬物は多くあるが, Na⁺チャネルサブタ

イブ選択性は高くない。Nav1.1, 1.2, 1.3 および 1.7 は神経系に広く発現し TTX- 高感受性でアミノ酸のホモロジーも高い。一方 Nav1.5, 1.8 および 1.9 は末梢組織に発現し TTX に対し抵抗性を示し, 前者とは異なった一群を形成している。Nav1.7, 1.8 および 1.9 は感覚神経に発現し, これらのチャネルの選択的な阻害薬は中枢神経系への副作用の少ない神経因性疼痛治

療薬となることが期待されている(5)。しかしそれぞれのチャネルに対し選択性の高い化合物を得ることが難しく、これら Na^+ チャネル創薬研究がなかなか進んでいないのが現状である。

Ca^{2+} チャネルは遺伝子的に L-, P/Q-, N-, R- および T- タイプファミリーに分けられ、いずれのタイプも創薬研究のターゲットと考えられている。Dihydropyridines, verapamil あるいは diltiazem などの L- タイプ Ca^{2+} チャネル抑制薬が高血圧や狭心症の治療薬として既に重要な地位を占めていることは広く認識されているが、アルツハイマー病においても L- タイプチャネル阻害薬が神経細胞内の Ca^{2+} 濃度を正常に戻し、低下した長期増強 (LTP) 作用を改善し認知機能の向上をもたらすという仮説の基に研究が進められている。N- タイプチャネル選択的な阻害薬である ω -conotoxin MIIIVa (Ziconotide) のポンプを用いた脊髄内投与が重篤な慢性痛治療の目的で承認され、低分子で経口投与可能な N- タイプ選択的な化合物が得られれば更に有用性の高い鎮痛薬になると考えられ、研究が続けられている。T- タイプの Ca^{2+} チャネルはいろいろな組織に発現しており、その阻害薬もてんかん、疼痛、高血圧の治療薬となる可能性は示されているが、評価系構築の難しさなどから創薬研究はあまり進んでいない。 K^+ チャネルは最も種類が多く、組織分布も広く、また 1 つの細胞にいくつもの K^+ チャネルが発現しているが、その生理的あるいは薬理的な重要性について未だ明確になっていないものが多い。その中で最も研究が進んでいるのは心臓の QT 延長に関係する KCNQ1 (Kv7.1) と hERG (Kv11.1) であろう。創薬ターゲットとしては T 細胞に存在する Kv1.3 チャネル阻害に基づく免疫抑制薬、心房細動の治療薬を目指した Kv1.5 阻害薬、また抗てんかん作用や鎮痛作用を期待した KCNQ2/3 の活性化薬などが注目されている。

3. 電位依存性イオンチャネル創薬研究の流れ

電位依存性イオンチャネルの創薬ターゲットとしての妥当性を検証することは必ずしも容易ではないが、ここではターゲットバリデーション以降の化合物探索について考える。初期探索において数十万～数百万の化合物ライブラリースクリーニングを行なう場合にはスクリーニングのスピードとコストが最も重要なファクターであろう。電位依存性イオンチャネルの 1 次スクリーニングには膜電位、 Ca^{2+} あるいは Na^+ 蛍光色素を用いた蛍光測定法、イオンフラックス測定法あるいはバインディングアッセイ法などが利用できるが、いずれの方法でもまず目的のチャネルを発現させた細

胞株を構築する必要がある。蛍光膜電位測定法の場合には必ずしも高発現細胞は必要としないが、他の方法ではスクリーニングの信頼性を確保するために高発現細胞が望ましく、安定高発現細胞株を得ることは最初の大きな課題となる。チャネルの発現が難しい場合には年の単位で時間を費やすこともある。バインディングアッセイ法は選択的なリガンドがある場合には十分活用できるが、電位依存性のチャネルに関しては選択的な化合物はない場合が多く、hERG チャネルなど一部のチャネルを除いては用いることはできない。またバインディングアッセイ法はチャネルの機能を見ているわけではないため情報の質としては他の方法より低い。チャネルを通り細胞に流れこむイオンによって引き起こされる膜電位変化を検出する蛍光膜電位測定法、 Ca^{2+} や Na^+ 感受性色素を用いた蛍光測定法、あるいはチャネルを通して流れたイオンの量を原子吸光によって検出するイオンフラックス法はいずれも間接的にチャネルの活性を見ることになり機能的評価と言える。どの方法も高いハイスループット性を有しているが、蛍光測定がスピードにおいて最も優れていると考えられ、384 well プレートを用いた蛍光測定法では 1 台の測定器で最大 1 日 3 万強の化合物評価が可能であり、週に 3 日測定するとしても、ほぼ 3 ヶ月で 100 万化合物の評価は終了することになる。ライブラリーのスクリーニングにより運良く化合物のヒットが得られたとしても、蛍光測定の場合には色素と化合物との相互作用、もともと細胞の存在したイオンチャネルやイオンポンプへの影響に基づくイオン濃度あるいは膜電位の変化、細胞膜やタンパクへの影響などによる色素への 2 次的影響などに起因する変化が起こり得るため、これらのヒットの中には多くの false positive/negative が含まれている。このため 2 次スクリーニングにおいてもある程度のスループット性を保ちつつより精度の高い評価技術が必要である。電位依存性イオンチャネルの場合、実験精度的にはパッチクランプにおいて他には無くオートメーションパッチクランプシステムが現在のところ最も適していると考えられる。以下に我々が試みた hERG チャネル評価系構築を例にとりてこれらの評価システムについて説明を加える。

4. 細胞の構築

hERG チャネル評価系構築では従来のパッチクランプ法に用いる細胞、蛍光膜電位測定用細胞およびオートメーションパッチクランプ用細胞の確立を別々に進めた。一般的にこれらの目的には HEK (Human Embryonic Kidney), CHO (Chinese Hamster Ovary) あ

るいは BHK (Baby Hamster Kidney) 細胞が用いられる。古典的パッチクランプ法ではすべての細胞が必ずしも大きな電流を有している必要が無く、ある程度の確率で電流が記録できれば十分に使用できる。HEK293 細胞は内在性の K^+ 電流を有しているが最も発現が容易で大きな電流を有した細胞が得られることから、最初はこの細胞で hERG チャンネルを発現させ古典的パッチクランプ法に用いた。膜電位蛍光測定法では、発現させた hERG チャンネルと他のイオン透過性のバランスで膜電位が決まることから、内在性のイオンチャンネルのレベルが低ければ hERG チャンネル発現量が低くても大きな反応が得られる。この目的には CHO 細胞が最も適している。実際、非発現細胞での KCl による脱分極刺激に対し HEK 細胞では大きな応答を示すが、CHO 細胞での応答は小さい。また膜電位蛍光変化を基準にクローンを選択したがウェスタンブロッティングでのタンパクの発現量と蛍光の変化は必ずしも相関しなかった。オートメーションパッチクランプではマルチウエルの各ウェルにあるパッチ電極に相当する穴にはまった細胞が大きな電流を示す場合のみ測定に使用できる。即ちできる限り多くの細胞が大きな電流を示さないと成功確率は著しく低くなってしまう。またパッチ電極に相当する穴に細胞がうまくフィットしないと正確な測定はできない。実際我々が用いている Molecular Devices 社の IonWork HT では HEK に比べ CHO や BHK の方が成功確率は高かった。クローン選択の段階からオートメーションパッチクランプを用いることにより効率的に高発現の細胞の獲得が可能である。上記いずれの方法においても他の性質として継代してもチャンネル発現量が変化しない、凍結融解しても性質が変わらない、また適当な増殖スピードをもっているといった点も考慮して、細胞を選んでいく必要がある。

5. 蛍光膜電位測定法

Bis-oxonol のような陰イオン性で膜透過性の蛍光色素は細胞膜の電位変化に応じて色素が細胞内外に移動する。色素は膜やタンパクと結合するとより強い蛍光を示す性質がある。この原理に基づいて古くからこのような色素が膜電位の測定に用いられていた。しかし以前の色素は膜電位変化に比べ蛍光変化は遅く KCl で瞬時に脱分極させた場合での蛍光強度変化の $t_{1/2}$ は約 4 分で電位変化との乖離も大きく HTS のような評価に用いるには限界があった。2001 年に Molecular Devices 社がより応答時間が速く ($t_{1/2}$: 17 秒)、電位変化との相関もよい蛍光膜電位色素が入手できるよ

うになり (6, 7), HTS による蛍光測定が著しく改善された。細胞膜電位は主に Na^+ , K^+ および Cl^- イオンの細胞内外の濃度とそれぞれのイオンの透過性によって決定され (図 1A, Goldman-Hodgkin-Katz の式), もともと Na^+ や K^+ チャンネルをほとんど持たない CHO 細胞の場合バックグランド電流も小さく静止膜電位はおおよそ -20 mV である。この細胞に hERG K^+ チャンネルを発現させると K^+ に対する透過性が上がることで細胞膜電位はおおよそ -60 mV まで過分極する。バックグランド電流も小さいのでパッチクランプで使用するほど hERG の発現量が多くなっても十分な電位変化が得られる。このような細胞に hERG チャンネルブロッカーを作用させるとチャンネル抑制に依存して K^+ チャンネルの透過性が減少し、それに伴い細胞膜電位も脱分極し、蛍光強度も増加する (図 1C, dofetilide)。ほぼ 100% 抑制されると hERG 発現前の -20 mV 程度の値を示すが、この値は細胞外液の KCl 濃度を control の 5 mM から 30 mM に増加させた時の hERG 発現細胞の膜電位に相当し、化合物適用後更に KCl を加え、化合物によってもたらされた蛍光強度変化の真偽判定の基準とした。E4031 や dofetilide など陽性対照薬を含め、パッチクランプ法で IC_{50} 値が得られている、構造的にも物性的にもかなり多様性に富んだおよそ 50 化合物を用いて実験系のバリデーションを行なった。図 1D にはパッチクランプの IC_{50} 値と $30 \mu M$ での蛍光強度変化 (dofetilide の強度変化を 100% として計算) の関係を示す。全体的にはある程度の相関は認められ、hERG 阻害活性の強い化合物は蛍光強度変化も大きく、蛍光強度変化にもとづいて阻害活性のおおまかな予想は可能であろう。しかし約 1/3 の化合物でパッチクランプで得られた IC_{50} の強さに比べ蛍光強度変化がかなり小さく false negative と判断されてしまう。これらの化合物は KCl に対する反応から大きく 2 群に分けられる。KCl を加えると大きな反応が得られる化合物群には 2 つの可能性が考えられた。1 つ目の可能性は溶解性が悪いために化合物が析出し実際の濃度は低かった。2 つ目の可能性として、電位依存性の抑制作用を示し静止膜電位付近でチャンネルが静止あるいは開口状態では結合は弱い、膜電位が脱分極しチャンネルが不活性化状態の時に強く結合する化合物は電位を制御していない、このような実験条件では作用が弱く現れることが考えられる。また false negative 化合物群の中に多く見られた別の現象は、化合物を作用させても蛍光強度変化は小さく、更に KCl を加えても蛍光強度変化が余り起こらないというものである。この場合原因は特定できないが、

図1 蛍光膜電位測定法

(A) 測定原理 イオン性の蛍光色素は図中の式で計算される膜電位に従って細胞内外に移動し、蛍光強度が変化する。(B) 蛍光膜電位測定法の実験手順。(C) hERG チャンネル発現 CHO 細胞における dofetilide の作用。蛍光強度変化の各点は下からコントロール、0.1、0.3、1、3、10、30 μM を示す。(D) 従来のパッチクランプ法で得た IC₅₀ 値と 30 μM における蛍光強度変化の相関。蛍光強度変化は dofetilide の 30 μM を 100 % として計算した。

化合物が蛍光色素との相互作用により蛍光スペクトラムに変化をもたらしている、あるいは細胞膜に作用し蛍光色素の移動を抑制してしまったなどが原因として考えられる。

以上述べたように蛍光膜電位測定法には false negative/positive の割合が高い、膜電位の制御ができないなどの欠点もあるが、1日に30000強のデータの取得が可能で、コストも1データ数十円、汎用性の広さ(いろいろな細胞やチャネルに適応可能)、小さな電流でも十分な電位変化を与える、特別な技術は必要としないなど、探索初期の電位依存性のチャネル評価には十分に耐え得るものである。

6. オートメーションパッチクランプ法 (図2)

従来から用いられている古典的パッチクランプ法は、人がマニピレータを操作しガラスで作ったパッチ用電極を細胞膜に接着させ、細胞に様々な刺激(電位変化、リガンド添加など)を与え、イオンチャネルを介して流れるイオンの流れを電氣的に検出する方法である。この方法によりイオンチャネルに作用する化合物

の電位依存性や頻度依存性も知ることができ、創薬研究では非常に重要な位置を占めている。しかし、習熟に時間を要し、熟練研究員でも1日に評価できるのは多くて10化合物程度であり、多検体スクリーニングは不可能である。一方、最近開発された多くのオートメーションパッチクランプシステムはマルチウェルのパッチプレートを用い、各ウェルの底にガラス電極の先端に相当する穴があいており、この穴の下側が電極内液を通す流路となっている。ウェル上部より細胞を撒き、旨くこの穴の上に細胞が乗りしっかりと接着できたときにパッチクランプが可能となる(図2A)。従ってパッチの成功確率には撒く細胞数、細胞のイオンチャネル発現効率、細胞の大きさや形などが重要なファクターとなる。これらのオートパッチクランプシステムが売りとしている特徴は、1) 高度な技術が必要とせず誰にでも簡単に操作できること、2) 1日に数百から数千ポイントのデータの取得が可能なこと、3) 取得するデータも従来のパッチクランプ法で得られるデータと殆ど遜色が無いほど正確である点である。これらについて Molecular Devices 社の IonWorks HT を

図2 従来のパッチクランプとオートメーションパッチクランプの比較

(A) パッチクランプ方法の違い, (B) hERG チャネル発現 CHO 細胞における hERG 電流の比較. 古典的およびオートメーションパッチクランプの +20 mV および -50 mV への電位固定時間は異なっているが電流波形に大きな差は見られない. オートメーションパッチの下側の電流波形は hERG チャネルブロッカー存在下での記録. (C) IonWorks HT オートメーションパッチクランプの実験手順. (D) 古典的パッチクランプ法と IonWorks を用いたパッチクランプ法で得られた hERG チャネル抑制の IC₅₀ 値の相関関係.

用いた結果について紹介する. 装置は本体とコンピューターのみで, 実験者の行なうことは細胞懸濁懸液, 薬液の準備, パッチプレートや薬液プレートの装着, およびコンピューター操作である. これらの操作をほぼマニュアルに従って行なえばよく, 特別な知識や技術は必要としない. 一連の実験に要する時間は, 各種溶液とシステム準備で1時間, 実際の測定の部分でおよそ1時間, 合計ではほぼ2時間である (図2C). 自動測定中に次の準備を開始できるので通常時間内で1日に5サイクルは可能である. IonWorks HT の場合 384 ウェルのうち4ウェルを用いて同じ化合物を評価するように設定されているので実際には1プレートあたり96化合物の評価が可能で, 5サイクル実験を行なえばほぼ500化合物の評価が実施できる. 4ウェルいずれもパッチが形成されたとしたら発現率50%の細胞であっても90%以上の確率で電流が記録できることになる. 我々の結果では, hERG 高発現細胞を 2×10^6 個/ml の濃度で撒いた時にパッチの成立しないウェルが約10%, 電流が小さく (0.3 nA 以下) 評価に使用できない細胞が約10%で実際には約80%の成功率

であり, どうかすべての化合物を評価できるレベルである. 細胞を撒く数をこれ以上上げてパッチの成功率はあまり上昇せず, 如何に高発現で, しっかり接着できる細胞を得ることができるかが成功率のキーポイントである. 我々の結果では HEK 細胞のパッチ成功率は他の CHO, BHK に比べかなり低く宿主細胞選びも重要なファクターである. 図2Bに古典的パッチクランプ法とオートメーションパッチクランプ法で得られた hERG 電流波形を示すがほぼ同等の電流が得られており精度的は古典的パッチクランプと遜色はない. また測定時間内で電流の run-down も少なく, 薬物による hERG 電流抑制の実験間誤差も小さく薬物評価には十分に使用できる. 図2Dに古典的パッチクランプ法と IonWorks HT で得られた hERG 電流抑制 IC₅₀ の関係を示した. 標準的 hERG チャネルブロッカーも含め構造的に多様性のある約40の化合物に関して両者はよい相関を示し, 膜電位蛍光測定法では false negative を示すような化合物の多くも IonWorks HT では評価できるようになった. しかし化合物の中には古典的パッチクランプ法の結果と乖離するもの,

また IonWorks HT で評価できない化合物も数は多くないが存在した。これらの化合物の多くは吸着性の高い化合物で評価中に、シリンジ、薬物プレートあるいはパッチプレートに吸着したために薬物濃度が低下した可能性がある。この点は IonWorks HT に限ったことではないが吸着性の高い薬物を多く扱うこともあるので吸着の少ない素材への改良が望まれる。また理由は不明であるがウェルに撒く細胞数が IC₅₀ 値に影響することも判明した。ウェルに撒く細胞濃度が 0.5×10^6 個/ml と 6×10^6 個/ml の場合、hERG チャネル抑制作用を持つ astemizole の IC₅₀ 値は細胞数が低い時には 36 nM であったが細胞が多い時には 237 nM であり、細胞数の低い方が従来のパッチクランプに近い値であった。少ない細胞数で実験をすることがよいという結果であるが、細胞数を少なくするとパッチの成功するウェルの確率は減少してしまい多検体評価と言う目的には逆行することになる。この点に関しては IonWorks HT の次世代機 IonWorks Quattro で改善が期待される。Quattro では 1 ウェルに 64 個の穴があり 1 つのウェルから複数の細胞から得られた合計の電流を記録することになる。即ち初代の IonWorks HT と比べ撒く細胞濃度が薄くても、また発現効率が多少低くてもデータが取得できる可能性が高い。これまでは 384 ウェルプレートを用いていても実際には 96 のデータしか取っておらずコストは 1 ウェル当たり数 100 円であったが、Quattro ではデータのとれないウェルが減少することが期待できるため、多ければ 384 のデータ取得も可能で、コストも 1/4 に低下することも期待できる。以上のように多検体評価の可能なオートメーションパッチクランプシステムはまだ解決されなくてはならない課題も残されているが、従来のパッチクランプと比べると桁違いに多くのデータを短時間で取得することが出来ようになり化合物の 2 次評価スクリーニングには十分に活用できるレベルに到達したと考えられる。

7. 最後に

イオンチャネルは創薬研究の中ではまだまだ未開拓の分野で魅力あるターゲットも残されている。今回、電位依存性イオンチャネル創薬研究に用いられる蛍光膜電位測定法、オートメーションパッチクランプ法について hERG チャネル多検体評価系の構築の経験をもとにその可能性と課題を論じたが、蛍光測定法とオートメーションパッチクランプ法の組み合わせは K⁺ チャネル以外の Na⁺ チャネルあるいは Ca²⁺ チャネルにも応用可能であり、既に幾つかのチャネルでは実際に創薬研究が実施されている。このような技術が発展してきた今、初期探索研究で律速となるのはむしろターゲットバリデーション、細胞の構築また化合物の最適化であろう。電位依存性イオンチャネルの場合生体内に特異的なリガンドが無く、また多くのチャネルでは選択性の高い化合物も得られておらず、ターゲットバリデーションも遺伝子改変動物、anti-sense や iRNA などのバイオリジカルな道具に頼るしかない。細胞の構築に関してはクローンの選択も古典的パッチクランプに頼るしかなかったが、クローン選択の段階から蛍光色素法やオートメーションパッチクランプ法を用いることによりチャネルを機能的に評価しより試験系に適した細胞を効率的に選ぶことができるようになった。今後この分野での技術や情報は更に向上していくと思われ、画期的新薬につながる創薬研究が進展していくことを切に望みたい。

文 献

- 1) Shieh CC. Drug Discov Today. 2004;9:551-552.
- 2) Willumsen NJ, et al. Receptors Channels. 2003;9:3-12.
- 3) Jurkat-Rott K, et al. Curr Pharm Biotechnol. 2003;4:221-238.
- 4) Sorota S, et al. Assay Drug Dev Technol. 2005;3:47-57.
- 5) Brich PJ, et al. Drug Discov Today. 2004;9:410-418.
- 6) Whiteaker KL, et al. J Biomol Screen. 2001;5:305-312.
- 7) Baxter DF, et al. J Biomol Screen. 2002;7:79-85.