

# Evaluation of stimulus frequency dependence of drug-induced hERG current inhibition under CiPA protocol

OKimihito Yoshikawa, Yoshio Matsumoto, Mayumi Obo, Yoshinori Yamamoto, Munehiro Nakagawa

## 目的

近年、薬剤の催不整脈作用の評価において、*in vitro*の評価系としてマルチチャンネルの検討が広く行われている。CiPAより実験条件を共通にするためにhERGなどのチャンネルについて電位プロトコールが提示された。現在、日本を含めCiPAプロトコールの有用性について検証されている。hERGチャンネルブロッカーの中には、hERG電流抑制作用が刺激頻度に依存する薬剤があることが知られている(D Stork et al., 2007)。しかし、CiPA電位プロトコールを用いた刺激頻度依存性の評価に関する知見は少ない。そこで、本研究ではhERG電流抑制作用が刺激頻度に依存するCisaprideおよび刺激頻度に依存しないBepidilを適用することで、CiPA電位プロトコールを用いたhERGチャンネルブロッカーの刺激頻度依存性の評価が可能か検討した。

## 方法

使用細胞: hERG導入HEK293細胞  
 測定方法(CiPA protocol 10.09.18 time-stampedに準拠)  
 > ホールセルボルテージクランプ法(室温)  
 > 細胞外液(mmol/L): 130 NaCl, 10 HEPES, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 12.5 Glucose (pH7.4)  
 > 細胞内液(mmol/L): 120 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 1.5 MgATP(pH7.3)  
 > 電位プロトコール(Fig1参照)  
 > 刺激頻度: 1秒(1Hz), 5秒(CiPA protocol, 0.2Hz), 15秒(0.067Hz)のいずれかで実施。  
 適用薬剤: CisaprideおよびBepidil  
 評価項目: Ramp-down phaseにおけるピーク電流値およびピーク電流出現時間の適用前値に対する変化

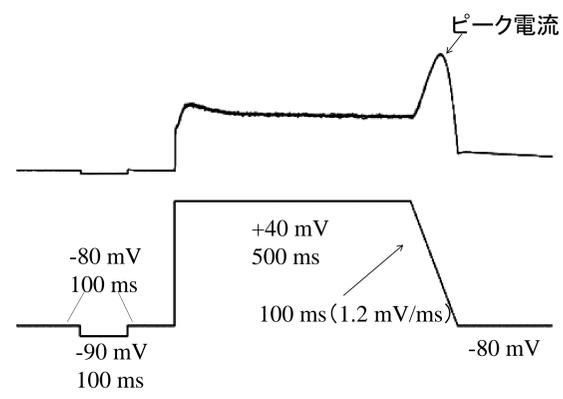


Fig1. CiPA電位およびhERG電流

## 結果

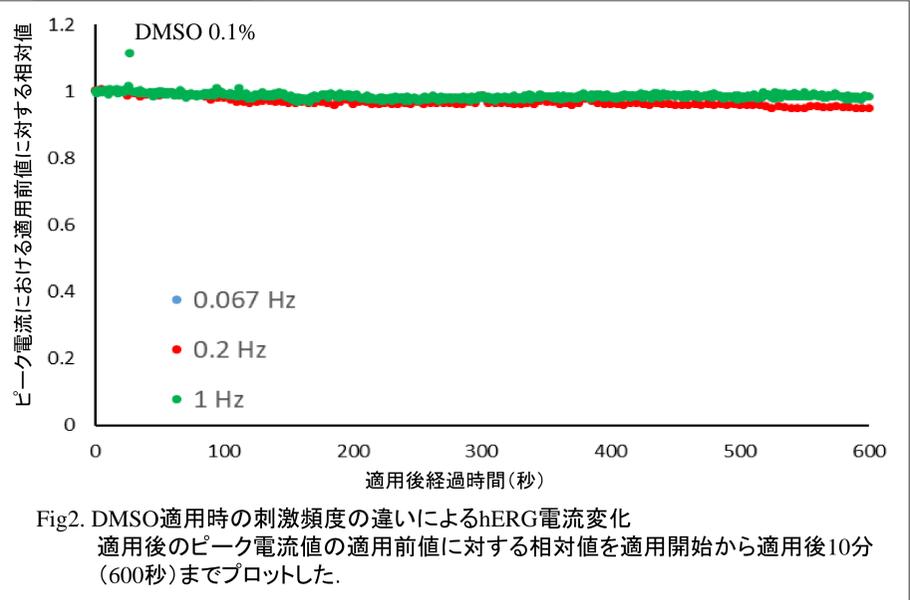


Fig2. DMSO適用時の刺激頻度の違いによるhERG電流変化  
 適用後のピーク電流値の適用前値に対する相対値を適用開始から適用後10分(600秒)までプロットした。

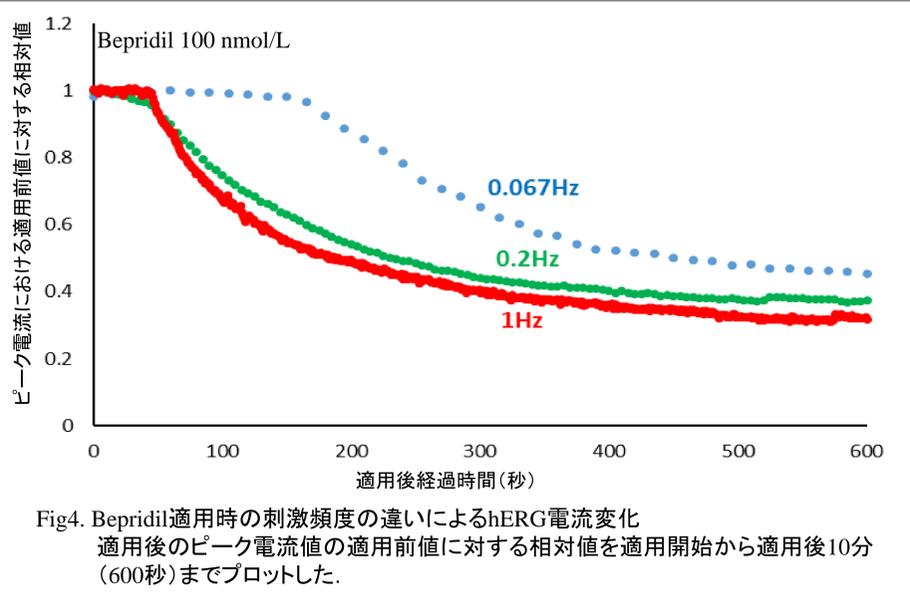


Fig4. Bepidil適用時の刺激頻度の違いによるhERG電流変化  
 適用後のピーク電流値の適用前値に対する相対値を適用開始から適用後10分(600秒)までプロットした。

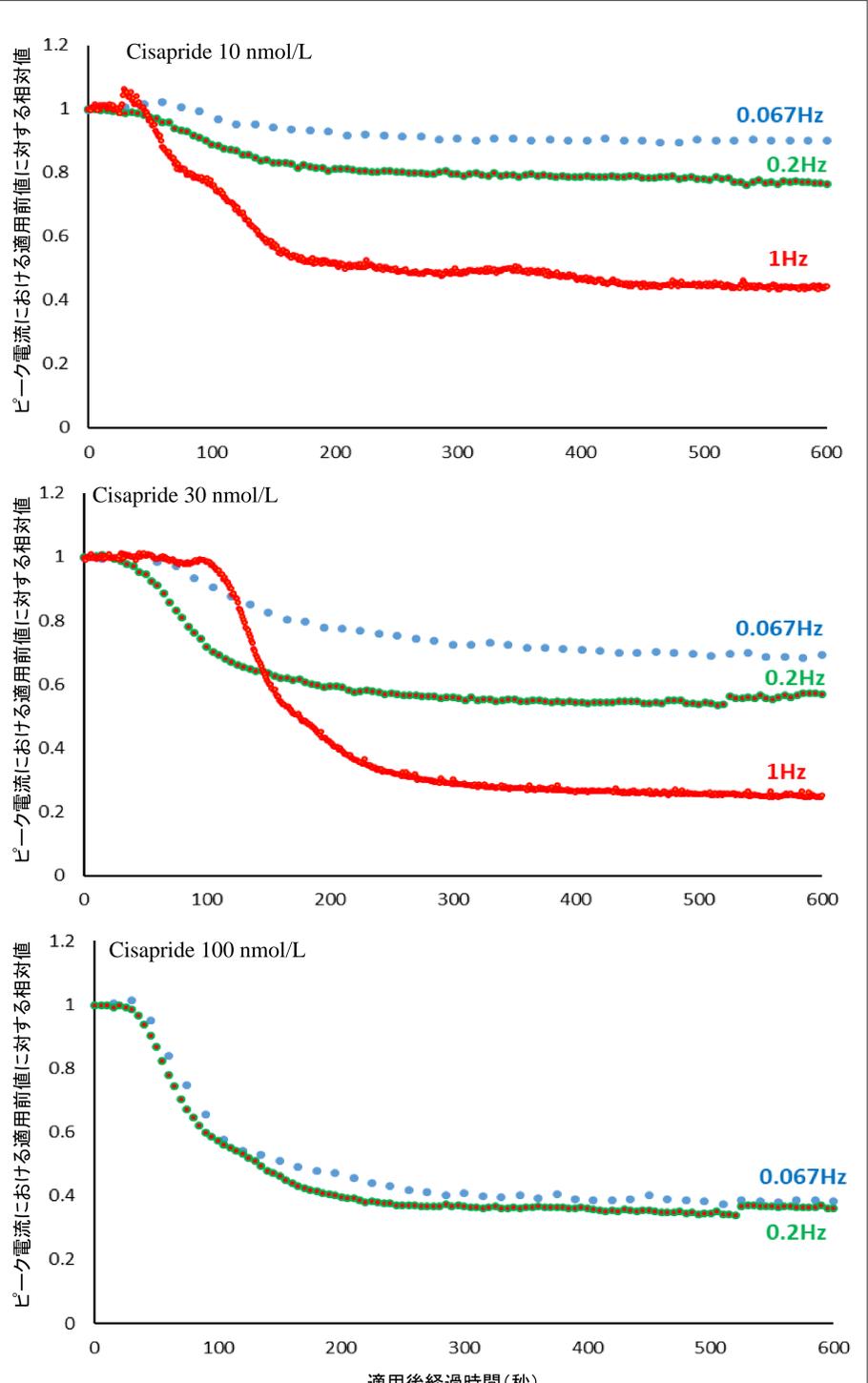


Fig3. Cisapride適用時の刺激頻度の違いによるhERG電流変化  
 適用後のピーク電流値の適用前値に対する相対値を適用開始から適用後10分(600秒)までプロットした。

Table1. 刺激頻度変化におけるピーク電流変化およびピーク電流出現時間の適用前値に対する相対値(%)

Drug	Conc.	刺激頻度	適用前値に対する相対値(%、平均値±SE)	
			ピーク電流	ピーク電流出現時間
DMSO	0.1%	0.067Hz (n=1)	96.0 #	99.9 #
		0.2Hz (n=5)	98.7±1.5	99.8±0.1
		1Hz (n=3)	98.0±0.8	99.7±0.1
Cisapride	10 nmol/L	0.067Hz (n=2)	89.9±1.0 #	99.8±0.0 #
		0.2Hz (n=5)	77.6±2.3	100.0±0.1
		1Hz (n=3)	44.1±6.5 *	99.9±0.3
	30 nmol/L	0.067Hz (n=4)	69.8±3.8 *	99.0±1.1
		0.2Hz (n=5)	49.0±1.7	98.8±1.4
		1Hz (n=3)	25.4±2.9 *	100.1±0.3
	100 nmol/L	0.067Hz (n=3)	39.6±6.3 *	98.1±1.2
		0.2Hz (n=5)	21.9±2.0	97.1±1.3
		1Hz	ND	ND
Bepidil	100 nmol/L	0.067Hz (n=3)	40.9±4.4	100.1±0.4
		0.2Hz (n=5)	35.9±2.4	100.5±0.2
		1Hz (n=3)	31.4±1.9	100.0±0.3

\* : 同一濃度の0.2 Hzと比較して有意差あり(Student's t-test, p<0.05)  
 #: n=2以下のため、統計は未実施。

## まとめ

- DMSO 0.1%において、0.067, 0.2, 1Hzいずれの刺激頻度条件下でhERG電流抑制作用は確認されなかった。
  - Cisapride 30 nmol/Lにおいて、0.2Hzと比較して0.067および0.1Hzの刺激頻度条件下でhERG電流抑制作用が有意に変化した。また、同様の傾向が10および100 nmol/Lで確認された。
  - Bepidil 100 nmol/Lにおいて、0.067, 0.2, 1Hzの刺激頻度条件下ではhERG電流抑制作用に違いは確認されなかった。
  - Cisapride, Bepidil, DMSOによる、刺激頻度変化におけるピーク電流出現時間への影響は確認されなかった。
- 以上の結果から、CiPAプロトコールを用いて、薬剤によるhERG電流阻害の刺激頻度依存性を評価できることが示唆された。本評価系を用いることで、薬剤の詳細な特性を明らかにすることができると期待される。