

#### 4) 非イオン性界面活性剤によるイオンチャネル阻害機構

研究代表者 野口 智弘

##### [研究目的]

非イオン性界面活性剤 Cremophor EL (CrEL) は、さまざまな疎水性化合物を可溶化する溶解補助剤として幅広く用いられている。例えば、抗癌剤パクリタキセルや免疫抑制剤シクロスポリンの製剤に CrEL は含まれている。これらの製剤の投与ではときに副作用として神経障害（感覚鈍麻、異痛、痛覚過敏、てんかん等）の発生が問題となる。これらの製剤に共通の溶媒として使用されている CrEL と神経障害の関連は従来より指摘されてきた。神経障害には神経の興奮性を決定する電位依存性イオンチャネルの機能異常が関与する。しかしながら、CrEL がイオンチャネルの機能にどのような影響を与えるのかはこれまでほとんど調べられていない。

本研究ではヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y にホールセルパッチクランプ法を適用し、CrEL が電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネル電流および  $\text{K}^+$  チャネル電流にどのような作用を及ぼすかを検討した。その結果、CrEL はチャネル電流を減少させるだけでなく、電流のカイネティクスも変化させることを見出した。これらの解析から CrEL は細胞膜への作用を通じてイオンチャネルの立

体構造に影響を与える可能性が示唆された。

【研究方法】

SH-SY5Y 細胞は通常濃度の半分である 5% 牛胎児血清を含んだ DMEM 培地中で培養された。血清濃度を下げることにより、細胞の分化を誘導した。実験に用いる 1 週間前には 4  $\mu$ M aminopterin を培地に加え、未分化細胞の増殖を抑制した。顕微鏡下で神経突起の伸長を指標として、分化した細胞を選び、ホールセルパッチ電流を記録した。細胞外液に CrEL を加えたときの電流の変化を調べた。

【結果および考察】

CrEL は濃度依存的に電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネル電流 (INa) および遅延整流性 K<sup>+</sup> チャネル電流 (IK) を抑制した (図 1)。低濃度の CrEL (<10 ppm) は INa を選択的に抑制するが、CrEL 濃度が高くなるにつれて (>1000 ppm)、その抑制効果は INa よりむしろ IK の方により強力に発揮される。INa は活動電位を発生させる電流成分であり、IK は上昇した活動電位を静膜電位へ引き戻す成分である。したがって、CrEL 濃度が低いときには INa のみが抑制されることから活動電位は発生しにくくなり、CrEL 濃度が高いときには INa より IK の方が大きく抑制されることから活動電位は発生しやすくなる。これらの結果は、薬剤の繰り返し投与による CrEL 蓄積の進行が神経細胞の興奮性を単純に抑制するのではなく亢進させる可能性もあることを示唆している。このことは、CrEL を含む製剤の使用が重なるにつれて感覚の麻痺だけでなく、ピリピリした痺れや刺すような痛みが生じてくる機序に関係するかもしれない。

CrEL は IK の振幅を減少させるだけでなく、その不活性化過程を加速した (図 2)。SH-SY5Y 細胞の IK は通常、比較的大きなふたつの時定数 (~300 ms、~3000 ms) を持つ不活性化過程を示した (図 2B、上段)。しかし、1000 ppm CrEL 存在下では IK の不活性化過程は比較的小さなふたつの時定数 (~20 ms、~200 ms) によって表された (図 2B、下段)。時定数の減少は CrEL が IK の不活性化を促進することを示す。また、CrEL 存在下では不活性化過程における時定数の数がひとつ増えたことから、CrEL が電位依存性 K<sup>+</sup> チャネルのとりうる不活性化状態の数を少

なくともひとつ増やすことを示唆している。すなわち、CrEL は電位依存性 K<sup>+</sup> チャネルの開口状態から不活性化状態への立体構造変化に影響を与える。非イオン性界面活性剤である CrEL は両親媒性であることから、細胞外液中から細胞の脂質二重膜に挿入されると考えられている。この細胞膜に挿入された CrEL は膜の流動性を変化させる。一方、X 線結晶解析は細胞膜中の電位依存性イオンチャネルが周囲の脂質分子と密接に結合していることを支持しており、分子動態シミュレーションはチャネル開口によって脂質二重膜の変形が生じることを予測している。本実験の結果は、CrEL がこのような膜-チャネル相互作用に介入することによって、K<sup>+</sup> チャネルの立体構造変化に影響を与える可能性を示唆している。

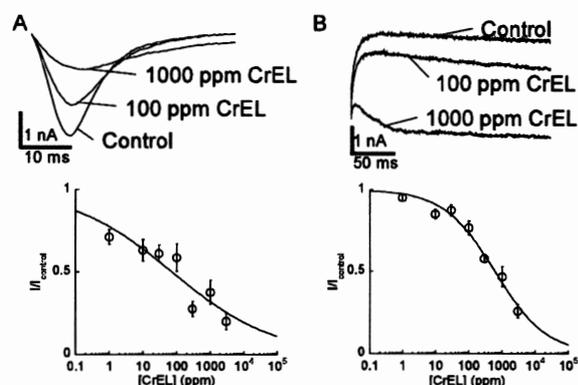


図 1 CrEL 濃度に依存したチャネル電流阻害。A、Na<sup>+</sup> チャネル電流 (上) と濃度抑制曲線 (下)。B、K<sup>+</sup> チャネル電流 (上) と濃度抑制曲線 (下)。

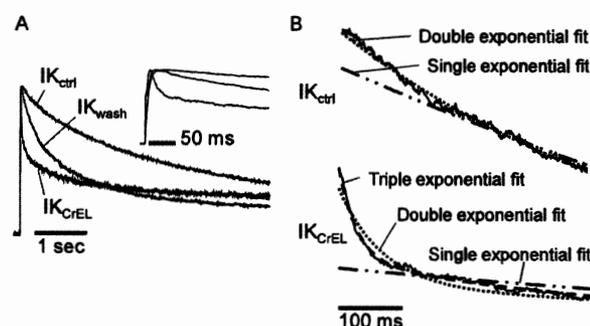


図 2 CrEL による K<sup>+</sup> チャネル電流不活性化過程の修飾。A、CrEL の有無における不活性化過程の比較。B、不活性化過程のカーブフィット。