OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大脳皮質体性感覚野錐体細胞の虚血負荷による神経細胞死に対する小胞体内Ca2+放出抑制の効果
Author(s)	河野, 奨
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69499
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

大脳皮質体性感覚野錐体細胞の虚血負荷による神経細胞死に対する小胞体内 Ca^{2+} 放出抑制の効果

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻　高次脳口腔機能学講座

河野　奨

緒　言

脳は多量の血液循環により多くの酸素およびグルコースを消費しているため，体のなかで最も虚血に弱い臓器の一つである．このため，低酸素・低血糖や外傷などにより神経細胞死が生じやすい(Lipton, 1999)．脳血管障害は，脳虚血により神経細胞死をきたす代表的な病態の一つであり，厚生労働省「平成 29 年人口動態統計」によると，日本人の死亡原因の４番目である．脳血管障害に伴う麻痺や失語など生活に支障をきたす大きな障害を残す厄介な疾患であるため，原因究明は急務である．

脳では，大脳皮質，海馬や小脳が，低酸素・低血糖の影響を受けやすいことが知られている(Ginsberg & Busto, 1989)．脳において，虚血時間が 6〜8 分を過ぎると神経細胞に不可逆的な変化が生じ，細胞死が引き起こされる(Lipton, 1996)．脳虚血による神経細胞死の機序としては，グルタミン酸大量放出による N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)受容体の活性化に伴って生じる細胞内 Ca^{2+}の過剰蓄積が良く知られている(Sattler & Tymianski, 2001)．興奮性アミノ酸であるグルタミン酸は，興奮性伝達物質として脳に豊富に存在し(Fonnum *et al.*, 1986)，高濃度で細胞外に存在すると，神経毒として作用する(Rothman & Olney, 1986; Choi *et al.*, 1987)．グルタミン酸の受容体は，α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic

acid(AMPA)，NMDA およびカイニン酸受容体の 3 つの種類に分類されており，AMPA およびカイニン酸受容体は Na^+を流入させ，NMDA 受容体は Ca^{2+}を流入させる．NMDA 受容体を介した Ca^{2+}の異常流入が，細胞死に深く関わっていると考えられている(Rothman & Olney, 1986; Choi *et al.*, 1987).

また，細胞外からの Ca^{2+}流入のみならず，細胞内 Ca^{2+}貯蔵部位である小胞体からの Ca^{2+}放出が，虚血に伴う神経細胞の不可逆性の変化発生に重要な役割を担うことが示唆されている(Szydlowska & Tymianski, 2010)．小胞体内からの Ca^{2+}放出機構には 2 種類の受容体が関与する．一つは，Ca^{2+}自身が Ca^{2+}放出を誘発する Ca^{2+}誘導 Ca^{2+}放出であり，小胞体膜上のリアノジン受容体を介して生じる．もう一つは，イノシトール三リン酸により小胞体からの Ca^{2+}放出を促すイノシトール三リン酸誘導 Ca^{2+}放出であり，小胞体膜上のイノシトール三リン酸受容体(IP_3受容体)を介して起こる(Clapham, 1995)．虚血時においては，リアノジン受容体および IP_3受容体の活性化を介した小胞体からの Ca^{2+}放出が，細胞死に寄与することが報告されている．例えば，細胞外 Ca^{2+}非存在下およびリアノジン受容体遮断薬であるダントロレンにより Ca^{2+}誘導 Ca^{2+}放出を抑制した状態で海馬スライス標本に虚血負荷をかけると，細胞内 Ca^{2+}の上昇が抑制されることが示されている(Dubinsky & Rothman, 1991; Mitani *et al.*, 1993)．また，細胞外 Ca^{2+}非存在下および小胞体への Ca^{2+}の取り込み阻害剤であるタプシガルジン存在下に

おいて，急性単離した海馬 CA1 細胞に虚血負荷を与えると，細胞内 Ca^{2+}の上昇が抑制されることが示されている(Larsen *et al.*, 2005)．さらには，海馬培養細胞では，リアノジン受容体や IP_3 受容体の活性化により小胞体内の Ca^{2+}が枯渇して，ストア作動性 Ca^{2+}チャネルが活性化され，その結果，細胞内 Ca^{2+}の過剰蓄積が引き起こされて，細胞死が生じることが報告されている(Berna-Erro *et al.*, 2009).

大脳皮質錐体細胞は，海馬錐体細胞と同様に脳虚血により神経細胞死が生じやすい(Ginsberg & Busto, 1989). しかし, 脳虚血によって生じる小胞体からの Ca^{2+}放出が，神経細胞死に対してどのような役割を果たすかについては不明な点が多い．本研究では，ホールセルパッチクランプ記録を用い，虚血負荷による神経細胞死に対し，小胞体からの Ca^{2+}放出抑制がどのような効果を示すかを検討した．

実験方法

本研究における実験は，大阪大学動物実験規程および大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規程に従って実施した(動歯-27-002-0).

1. 脳幹スライス標本の作製

生後 14〜21 日齢の C57BL/6J マウス(日本動物)をイソフルラン深麻酔下で断頭した後，直ちに脳全体を摘出し，95%酸素および 5%二酸化炭素の混合ガスを飽和させ氷冷した調整人工脳脊髄液(modified artificial cerebrospinal fluid ; M-ACSF)［組成 : Sucrose(214 mM), $NaHCO_3$(26 mM), KCl(1.8 mM), KH_2PO_4(1.2 mM), $CaCl_2$(0.5 mM)，$MgCl_2$(2.8 mM)，D-glucose(50 mM)］に 5 分間浸漬した．脳ブロックから大脳のみを残し, 硬膜除去後に, スライサー(MICROSLICER DTK-1000, 堂阪イーヱム社製)を用いて大脳皮質体性感覚野を含む厚さ 300 μm の冠状断スライス標本を作製した．スライス標本は，室温の M-ACSF と標準人工脳脊髄液(normal ACSF ; N-ACSF)［組成 : NaCl(126 mM)，$NaHCO_3$(26 mM)，KCl(1.8 mM), KH_2PO_4(1.2 mM)，$CaCl_2$(2.0 mM)， $MgCl_2$(1.3 mM)，D-glucose(10 mM)］の等量混合液内で 30 分，続いて N-ASCF 内で 30 分以上回復してから，電気生理学的記録に供した.

2. 電気生理学的記録

電極作製装置(P-830，NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENT LAB.社製)を用いて，フィラメント付き硼珪酸酸ガラス微小管(外径 1.50 mm，内径 1.17 mm；GC150TF-15，Warner Instruments 社製)からパッチ用電極(先端径約 1.5 μm)を作製し，記録細胞の標識のためのバイオサイチンを添加した電極内液［組成：K-gluconate(118 mM), KCl(18 mM), NaCl(14 mM), ATP-Mg(2 mM), GTP-Na_3(0.3 mM), HEPES(10 mM)，EGTA(0.1 mM)，バイオサイチン(10 mM)；KOH で pH 7.3 に調整］を充填した．パッチクランプ用増幅器(AxoPatch 1D，Molecular Devices 社製)を用いてホールセルパッチクランプ記録を行った．微分干渉正立顕微鏡(Axioskop，Zeiss 社製)のステージ上に設置された記録用チャンバーへ大脳皮質スライス標本を移して, 弱拡大観察下(対物レンズ Plan –NEOFLUAR 5×/0.15)で，体性感覚野を同定した．強拡大観察下(対物レンズ LUMPlanFI 60×/0.90 w)で，スライス表層に位置する第 II/III 層錐体細胞の細胞体中央部の細胞膜に，マイクロマニピュレーター(PCS-5000；Burleigh 社製)を用いてパッチ電極先端を密着させ，超高抵抗封鎖(> 5 GΩ)を確認した後，電極内側の細胞膜を破りホールセルパッチ(whole-cell patch)を形成した．この時，直列抵抗は 15 MΩ未満であった．記録用チェンバー(容積 1.0 ml)には，N-ASCF を流速 2.0 ml/min および液温 37 度で持続的に灌流した．

パッチクランプ用増幅器からの信号はアナログーデジタル変換器(DigiData 1322A，Molecular Devices 社製；サンプリング周波数 10 kHz)を通じてパーソナルコンピューター(PowerMac G3，Apple 社製)へ入力し，専用ソフトウェア(AxoGraph 4.9，Axon Instruments 社製)を用いてハードディスクにデータファイルとして記録した．データの計測には，専用の解析ソフト(AxoGraph X)を用いた．大脳皮質神経細胞の発火パターンから，錐体細胞か抑制性神経細胞かを分類するため，電流固定下で，刺激装置(SEN-3301，日本光電社製)とアイソレーター(SS-201J，日本光電社製)を用いて持続時間 1 秒の脱分極性電流パルスを与え，膜電位応答を記録した．虚血による電気生理学的変化を観察するため，電流固定下で膜電位の経時変化を記録した．虚血状態を再現するため，無酸素・無グルコース溶液を脳スライス標本に灌流した．無酸素状態は，人工脳脊髄液を 95%窒素および 5%二酸化炭素の混合ガスで通気することにより誘導し，無グルコース状態は，通常の人工脳脊髄液から D-glucose を除くことにより誘導した．小胞体からの Ca^{2+}放出を減少させるため，電極内液にリアノジン受容体阻害薬である ruthenium red(100 μM)およびイノシトール三リン酸受容体阻害薬である xestospongin C(10 μM)のいずれか一方または両方を充填した(以下，RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群)．カエルの骨格筋や心筋において，ruthenium red の IC_{50} 値(反応を 50%阻害する薬剤の濃度)は 2～3 μM 程度で(Baylor *et al.*, 1989)，100 μM

の ruthenium red では，リアノジン受容体の働きを 90%以上阻害することが知られている(Xu *et al.*, 1999)．そのため，リアノジン受容体を阻害するために，十分と考えられる 100 µM に濃度を設定した．また，PC12 細胞では， xestospongin C の IC_{50} 値は 0.36 µM であり，10 µM の xestospongin C では，イノシトール三リン酸受容体の働きを 90%以上阻害することが知られている(Gafni *et al.*, 1997)．したがって，xestospongin C の濃度を 10 µM と設定した．また，ストア作動性 Ca^{2+} チャネルを介した細胞内 Ca^{2+}の過剰蓄積を抑制するため，ストア作動性 Ca^{2+}チャネル阻害薬である SKF96365(10 µM)を，虚血前および虚血中に灌流投与した(以下，SKF 群)．ストア作動性 Ca^{2+}チャネルを阻害する場合，SKF96365 の IC_{50} 値は 8～12 µM 程度で(Merritt *et al.*, 1990) ，PC12 細胞において，通常 10～50 µM 程度の濃度域で用いられる(Varnai *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013) ． 本研究では，SKF96365 について 10 µM と濃度を設定した．全ての試薬は，Sigma-Aldrich 社製のものを使用した．

3. バイオサイチン染色

虚血負荷前および虚血負荷後の電気生理学的記録終了後，スライス標本を Zamboni 固定液(4% formaldehyde，75% saturated picric acid，0.1 M Na_2HPO_4 ; NaOH で pH 7.2 に調整)(Okamoto *et al.*, 2016)で一晩以上固定した．固定した標本を 0.1

M phosphate-buffered 0.9% saline(PBS；pH 7.4)で洗浄した後，0.3% Triton X-100 を含む 0.1M PB で洗浄し，内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するため，1% H_2O_2 を含む 0.1M PB で洗浄した．その後，0.3% Triton X-100 を含む PBS で，50 倍希釈した avidin: biotinylated enzyme complex (ABC; VECTASTAIN Elite ABC，Vector Laboratories，Burlingame，CA，USA)を 1 晩反応させた．0.1M PB で洗浄した後，コバルト・ニッケル増感法による DAB 反応を行った．標本を PBS で洗浄した後スライドガラスに貼り付け, 標本用包埋剤(VECTASHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories 社製)とカバーグラスを使って封入し, 光学顕微鏡で観察した.

4. 統計学的解析

マウス大脳皮質スライス標本に control 条件下(以下，Cont 群)で無酸素・無グルコース溶液を灌流し, 虚血負荷を開始すると, 虚血初期には緩徐な脱分極が生じ, 5~12 分後から急峻な脱分極が発生して，膜電位が消失し，細胞膜に不可逆的変化が生じていた(図 1)．このため，5 つの条件下(Cont 群，RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群)で膜電位の経時変化を記録した後，急峻脱分極電位の最大勾配，発生潜時，最大勾配時点の膜電位，振幅，最大膜電位について比較検討した(図 1)．最大勾配は，全測定区間において 10 ms 間隔ごとの勾配を求め，その最大値とした．発生潜時は，無酸素・無グルコース溶液の投与開始時点から，

最大勾配を示す時点までの時間を計測し，また，その時点における膜電位を計測した．最大膜電位は，最大勾配を示す時点から 4 分後までの区間において，最も大きい膜電位を計測した．振幅は，静止膜電位から最大膜電位までの電位を計測した．データは平均±標準偏差の形で表示した．対応のない 5 群間の平均の差の検定には，一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い，多重比較検定は Fisher's LSD test を使用した．有意水準は 5%とした．

結　果

1. 大脳皮質体性感覚野第 II/III 層における錐体細胞の同定

本研究では, 大脳皮質体性感覚野第 II/III 層に位置する錐体細胞を対象として, 虚血負荷に対する影響を検討した. 大脳皮質体性感覚野には, 錐体細胞や抑制性神経細胞といった様々な種類の神経細胞が混在しているので, 虚血負荷前に, スライス標本中の神経細胞の形態および発火パターンにより, 錐体細胞の同定を行った. 大脳皮質錐体細胞において, 膜電流固定下で脱分極性電流パルスに対する膜電位応答の発火パターンは regular-spiking であり, 発火発生の時間間隔の増加, 即ち. 発火の順応が認められることが確立されている(Zhao *et al.*, 2005; Morishima & Kawaguchi, 2006). また, 抑制性神経細胞の発火パターンは fast-spiking であり, 発火の順応が認められないことが知られている(Kawaguchi, 1995) . 錐体細胞の発火パターンの 1 例を図 2A に示す. この細胞の発火パターンは regular-spiking であり, 発火の順応が認められた. また, バイオサイチンによって標識された同じ錐体細胞の染色像では, 細胞体は錐体形を示し, 尖端樹状突起は大脳皮質表層へ向かって伸びていることが確認された(図 2B). 一方, 抑制性神経細胞のおり 1 例を図 2C, D に示す. 発火パターンは fast-spiking であり, 発火の順応がほとんど認められなかった(図 2C). バイオサイチンによって標識

された抑制性神経細胞の染色像では，軸索が細胞体をバスケット状に囲んでいる様子が観察された(図 2D) ．本研究では，錐体細胞を対象として，虚血負荷に対する影響を検討したため，抑制性神経細胞においては，虚血負荷に対する影響を検討しなかった.

2. 虚血負荷による錐体細胞の細胞構築変化

次に，バイオサイチン染色を用いて，虚血負荷により，錐体細胞の細胞構築がどのように変化するかを観察した. 虚血負荷後，急峻脱分極電位発生以前にスライス標本を固定し，錐体細胞の形態を観察したところ(n = 3)，細胞体や樹状突起に形態変化が殆ど認められなかった(図 3A)．しかし，急峻脱分極電位発生直後にスライス標本を固定し，錐体細胞の形態を観察したところ(n = 2)，細胞体が膨化し，細胞体や樹状突起の染色性が顕著に低下していた(図 3B).

3. 虚血負荷に対する RR，Xest C，SKF の効果

図 4 では，Cont 群(A)，RR 群(B)，Xest C 群(C)，RR + Xest C 群(D)および SKF 群(E)における代表的な膜電位変化を示す．急峻脱分極電位の発生潜時は，Cont 群と比較して，RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群において，延長していることが観察された．また，急峻脱分極電位の最大勾配が，Cont 群と比較して，

RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群において，緩やかになっていることが観察された.

図 5 では，Cont 群(A，n = 10)，RR 群(B，n = 7)，Xest C 群(C，n = 7)，RR + Xest C 群(D，n = 7)および SKF 群(E，n = 7)における，虚血負荷前の静止膜電位，虚血負荷により生じる急峻脱分極電位の最大勾配時点の膜電位，最大膜電位を示す. 記録した全ての細胞において, 最大勾配時点の膜電位および最大膜電位は, 約 20～30 mV 毎に上昇していた.

図 6 から図 10 において, 急峻脱分極電位の発生潜時, 最大勾配時点の膜電位, 最大勾配，最大膜電位，振幅の計測値をまとめた結果を示す. 急峻脱分極電位の発生潜時は，Cont 群，RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群の順に，8.3 ± 2.3 分，15.7 ± 4.7 分，17.1 ± 8.8 分，23.3 ± 8.5 分，21.8 ± 8.8 分であり，RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群では，Cont 群と比較して，有意に延長していた(RR 群：$p < 0.05$ vs Cont 群；Xest C 群：$p < 0.03$ vs Cont 群；RR+Xest C 群：$p < 0.01$ vs Cont 群；SKF 群：$p < 0.01$ vs Cont 群) (図 6).

急峻脱分極電位の最大勾配時点の膜電位は，上記と同様の順に，–49.7 ± 6.8 mV，–47.6 ± 10.0 mV，–49.8 ± 10.6 mV，–44.9 ± 9.7 mV，–53.1 ± 11.6 mV であり，5 群の間に有意差は認められなかった(図 7). 急峻脱分極電位の最大勾配は，上記と同様の順に，8.7 ± 2.7 mV/秒，5.5 ± 1.5 mV/秒，5.0 ± 2.7 mV/

秒，1.9 ± 1.2 mV/秒，4.3 ± 1.7 mV/秒であり，RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群では，Cont 群と比較して，有意に減少していた(RR 群：$p < 0.01$ vs Cont 群；Xest C 群：$p < 0.01$ vs Cont 群；RR+Xest C 群：$p < 0.01$ vs Cont 群；SKF 群：$p < 0.01$ vs Cont 群) (図 8)．また，RR+Xest C 群では，RR 群および Xest C 群と比較して，有意に減少していた(RR 群：$p < 0.01$ vs RR+Xest C 群；Xest C 群：$p < 0.02$ vs RR+Xest C 群) (図 8).

最大膜電位は，順に，–15.4 ± 9.1 mV，–18.5 ± 6.0 mV，–22.7 ± 13.5 mV，–16.5 ± 5.8 mV，–29.8 ± 8.8 mV であり，SKF 群では，Cont 群と比較して，有意に深い膜電位を示していた($p < 0.01$) (図 9)．また，SKF 群では，RR 群および RR+Xest C 群と比較して，有意に深い膜電位を示していた(RR 群：$p < 0.04$ vs SKF 群；RR+Xest C 群：$p < 0.02$ vs SKF 群) (図 9)．急峻脱分極電位の振幅は，順に，62.8 ± 12.7 mV，65.0 ± 3.9 mV，61.3 ± 15.3 mV，61.6 ± 5.8 mV，55.5 ± 7.1 mV であり，5 群の間に有意差は認められなかった(図 10).

考　察

脳が正常な機能を保つためには酸素とグルコースの供給が必須であり，虚血時間が 6 分を過ぎると神経細胞は機能的に不可逆的変化を示す．本研究において，マウス大脳皮質第 II/III 層錐体細胞に対し，虚血負荷を与えると，緩徐な脱分極電位が生じ, 虚血負荷 5〜12 分後に急峻な脱分極電位が発生した. そして, 膜電位・膜抵抗は消失し, 細胞膜に不可逆的変化が生じることが明らかになった. こうした膜電位変化は，脳虚血による大脳皮質表面直流電位変化と一致しており(Hansen, 1985)，脳虚血モデルとして有用であるといえる．また，本研究の結果から，虚血負荷による神経細胞死に対し，小胞体からの Ca^{2+}放出を抑制することにより，神経保護作用が生じる可能性が示唆された.

これまでの知見から，虚血負荷により生じると考えられる神経細胞死の過程を図 11 に示す．まず，虚血に伴い ATP が減少するため，Na^{+}-K^{+}ポンプの機能低下による細胞外 K^{+}濃度の上昇が起こり，細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じる(Tanaka *et al.*, 1997)．そして，細胞外グルタミン酸濃度の上昇に伴う NMDA 受容体の活性化により，細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が生じる(Sattler & Tymianski, 2001). また, 細胞内 Ca^{2+}貯蔵部位であるリアノジン受容体および IP_3 受容体が活性化され, 小胞体から Ca^{2+}の放出が生じ, 細胞内 Ca^{2+}濃度がさらに上昇する(Verkhratsky,

2005)．さらには，小胞体内の Ca^{2+}が枯渇すると，ストア作動性 Ca^{2+}チャネルが活性化される(Berna-Erro *et al.*, 2009) (図 11)．

虚血が進行し，Na^{+}-K^{+}ポンプの機能が破綻すると，急峻脱分極が発生する．また，Ca^{2+}依存性酵素の活性化により，非選択的イオン(Na^{+}，Ca^{2+}，Cl^{-}等)の透過性の上昇が生じ，細胞の膨化が起こる(Larsen *et al.*, 2005; Brisson & Andrew, 2012)．最終的に，錐体細胞の膜電位が消失し細胞膜の破壊が引き起こされるものと考えられる．また，幼若ラットの大脳皮質体性感覚野錐体細胞において，急峻脱分極電位発生後，caspase-3 が活性し，神経細胞死が生じることが知られている(Albrecht *et al.*, 2005)．したがって，本研究において，細胞の膨化(図 3) および急峻脱分極の発生と膜電位の消失(図 4)が生じていることから，膜電位消失後，神経細胞死が生じていると考えられる．これまでの海馬錐体細胞を用いた研究では，小胞体からの Ca^{2+}放出によって小胞体の Ca^{2+}濃度は低下するが，Ca^{2+}緩衝剤によって細胞質の Ca^{2+}濃度を維持している条件下では，発生潜時の延長のみ生じることが示されている(Yamamoto *et al.*, 1997)．一方，本研究により，大脳皮質体性感覚野錐体細胞において，小胞体からの Ca^{2+}放出を抑制することで小胞体の Ca^{2+}濃度は維持され，細胞質の Ca^{2+}濃度も維持している条件下では，発生潜時の延長だけでなく，最大勾配も減少することが確認された．つまり，小胞体の Ca^{2+}濃度の維持により，最大勾配が減少する可能性が新たに示唆された．

1. 実験的虚血により生じる錐体細胞の膜電位変化

虚血負荷直後，ほとんどの第 II/III 層錐体細胞において，緩徐な脱分極電位が認められた(図 1)．これまでの研究により，海馬錐体細胞において，Na^+-K^+ポンプ抑制薬であるウアバインあるいは高濃度の K^+(10～20 mM)溶液を人工脳脊髄液に添加して投与すると，緩徐な脱分極電位が誘導されることが示されている(Fujiwara *et al.*, 1987)．また，non-NMDA 受容体遮断薬である CNQX や NMDA 受容体遮断薬である AP5 によって，緩徐な脱分極電位が抑制されることが見出されている(Tanaka *et al.*, 1997)．これらの報告から，緩徐な脱分極電位は，Na^+-K^+ポンプの機能低下による細胞外 K^+濃度上昇や細胞外グルタミン酸濃度の上昇が原因と考えられる．

さらに，虚血負荷後，緩徐な脱分極電位が発生した後，急峻な脱分極電位が発生していた(図 4). 脳梗塞発生時, 虚血状態になってから数分で, 細胞膜上の Na^+-K^+ポンプが破綻し，細胞膜を介して大量のイオンの流入と流出が起きることが知られており(Kaminogo *et al.*, 1998)，この現象は，虚血性脱分極と呼ばれている(Hossmann, 1994)．この状態では，神経細胞の再分極に多大なエネルギーが消費されるため，神経細胞の Na^+-K^+ポンプの機能が低下して，細胞膜のホメオスタシスの維持が難しくなり，長く続くと不可逆的壊死(梗塞)が生じる(Hossmann, 1994)．本研究で観察された虚血負荷により生じる急峻な脱分極電位の発生が，

虚血性脱分極に相当することが示唆されているため(Brisson & Andrew, 2012), Na^+-K^+ポンプの機能不全が，急峻な脱分極電位の発生に主要な役割を果たしていると考えることができる．本研究の結果において，リアノジン受容体や IP_3 受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} 放出およびストア作動性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} の流入を抑制することにより, 急峻な脱分極電位発生までの潜時が延長していたことから, 虚血による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制することで, Na^+-K^+ポンプの機能不全が抑制された可能性が示唆される．心筋では，ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度過剰により ATP の産生が減少し，その結果，Na^+-K^+ポンプの機能不全が引き起こされることが示されている(Santulli *et al.*, 2015)．大脳皮質第 II/III 層錐体細胞においても，虚血時，同様の機序により，Na^+-K^+ポンプの機能不全が生じているものと考えられるため, 小胞体からの Ca^{2+} 放出およびストア作動性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} の流入の抑制が，神経保護作用に作用する可能性が高い．

また，本研究では，小胞体からの Ca^{2+} 放出およびストア作動性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} の流入の抑制により，急峻脱分極発生時における最大勾配が減少することを見出した．つまり，小胞体からの Ca^{2+} 放出およびストア作動性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入の抑制が，神経細胞死の遅延に寄与していることが明らかになった．急峻脱分極電位の最大勾配は，急速な膜電位変化をもたらすイオンチャネル(電位依存性 Na^+ チャネルや電位依存性 Ca^{2+} チャネル等)の開口確率が関

与しており，急峻脱分極発生時，非選択的イオン(Na^+，Ca^{2+}，Cl^-等)の透過性上昇が生じることが報告されている(Tanaka *et al.*, 1997)．実際，急峻脱分極発生時のバイオサイチン染色画像において，細胞体や樹状突起の染色性が低下していたことから(図 3B)，急峻脱分極電位発生以前では，錐体細胞の形態は殆ど変化しないが，急峻脱分極電位発生直後に，非選択的なイオン(Na^+，Ca^{2+}，Cl^-等)の透過性上昇が生じる可能性が示唆される．イオンチャネルの開口確率の増大においては，Ca^{2+}依存性酵素(カルモジュリン依存性キナーゼ等)の活性化が重要な役割を果たすことが示されている(Orrenius *et al.*, 1989)．したがって，小胞体からのCa^{2+}放出およびストア作動性 Ca^{2+}チャネルからの Ca^{2+}流入の抑制により，Ca^{2+}依存性酵素の働きが抑制され，その結果，急峻脱分極発生時の非選択的イオン(Na^+，Ca^{2+}，Cl^-等)の透過性上昇をもたらすイオンチャネルの開口確率の増大が抑制されたと考えることができる．また，本研究において，RR+Xest C 群では，RR 群および Xest C 群と比較して，有意に最大勾配が減少していた(図 7)．これらの結果から，リアノジン受容体または IP_3 受容体のどちらか一方を抑制した時と比較して，リアノジン受容体および IP_3 受容体を同時に抑制した方が，神経保護作用が増強されると思われる．また，海馬 CA1 錐体細胞において，1 つの小胞体にリアノジン受容体および IP_3 受容体が共に発現していることが報告されている(Nakamura *et al.*, 1999; Power & Sah, 2002)．リアノジン受容体と IP_3 受容体のどち

らか一方を抑制した時と同時に抑制した時を比較したところ，発生潜時の延長や最大勾配の減少において，相加性を示していなかった．このことは，1 つの小胞体にリアノジン受容体および IP_3 受容体が共に発現していることが原因であると考えられる．小胞体からの Ca^{2+}放出およびストア作動性 Ca^{2+}チャネルからの Ca^{2+}流入の抑制により，最大勾配が減少する一方，最大勾配を示す時点における膜電位には，5 群の間に有意差は認められなかった(図 8)．このことから，本研究で使用した阻害剤は，急峻脱分極発生に寄与するイオンチャネル(電位依存性 Na^+チャネルや電位依存性 Ca^{2+}チャネル等)を活性化する膜電位に影響を及ぼさないことが示唆される．

虚血負荷により，急峻な脱分極電位が発生した後，細胞膜に不可逆的変化が生じていた(図 4). 各条件下における急峻脱分極後の最大膜電位を比較したところ，SKF 群では，Cont 群，RR 群および RR+Xest C 群と比較して，有意に深い膜電位を示していた(図 9)．SKF は，ストア作動性 Ca^{2+}チャネルからの Ca^{2+}流入を抑制することから，最大膜電位の差異は，細胞外から細胞内へ流入した Ca^{2+}流入に起因している可能性が示唆される．一方，振幅を比較したところ，5 群の間に有意差は認められなかった(図 10)．この結果から，虚血負荷により生じた非選択的イオン(Na^+，Ca^{2+}，Cl^-等)の流入量は，5 群の間で差異が生じていなかったことが示唆される．

2. 脳虚血と小胞体からの Ca^{2+}放出およびストア作動性 Ca^{2+}チャネルからの Ca^{2+}流入

小胞体は，虚血時において過剰な Ca^{2+}を緩衝することにより細胞内 Ca^{2+}ホメオスタシスを保つ働きがあり，こうした機構が，小胞体ストレスや細胞死に対する抑制作用を示すと考えられている(Vergun *et al.*, 1999)．しかし，小胞体内に過剰な Ca^{2+}が蓄積すると，逆に小胞体から Ca^{2+}を放出し，神経細胞死を引き起こす(Mattson *et al.*, 2000)．脳虚血時における小胞体からの Ca^{2+}放出は，リアノジン受容体および IP_3 受容体を介して行われる．リアノジン受容体は，細胞質 Ca^{2+}によって活性化され，一酸化窒素により活性化される機構も報告されている(Kakizawa *et al.*, 2012)．リアノジン受容体には，3 つのサブタイプ(1～3 型)が存在し，1 型リアノジン受容体は，骨格筋や小脳プルキンエ細胞，2 型リアノジン受容体は，心筋，脳や膵臓，3 型リアノジン受容体は，平滑筋や脳などに発現が認められる(Giannini *et al.*, 1995)．3 つのサブタイプの中で，2 型リアノジン受容体が中枢神経系において主要な役割を果たしていると考えられており，虚血時においては，ラット大脳皮質に発現している 2 型リアノジン受容体の活性化が亢進し，細胞死が導かれることが報告されている(Bull *et al.*, 2008)．

一方，IP_3 受容体は，IP_3 が結合することによって活性化され，細胞質 Ca^{2+}によっても活性化される(Verkhratsky, 2005)．IP_3 受容体においても，3 つのサブタイ

プ(1～3 型)が存在し(Foskett *et al.*, 2007)，1 型 IP_3 受容体は主に神経細胞に発現しており (Yamada *et al.*, 1994)，2 型 IP_3 受容体は主にアストロサイトに豊富に発現している(Petravicz *et al.*, 2008)．3 型 IP_3 受容体も 1 型 IP_3 受容体と同様に神経細胞に発現しているが，1 型 IP_3 受容体と比較すると，発現量が非常に少ないことが明らかにされている(Bodalia *et al.*, 2013)．マウス大脳皮質培養細胞において，ホスホリパーゼ C が活性化され，ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸が活性化される．そして，IP_3 が放出されると，IP_3 受容体を介した小胞体からの Ca^{2+}放出により，小胞体ストレスが生じることが示されている(Chen *et al.*, 2008)．分子生物学的手法によって，2 型リアノジン受容体や 1 型 IP_3 受容体が，大脳皮質錐体細胞の脳虚血時における神経細胞死に深く関わっていることが報告されているが，電気生理学的手法による報告例は極めて少ない．また，様々な虚血性疾患の病態生理を理解するために，これらの受容体を含めた小胞体 Ca^{2+}動態の解明は，望まれている．今回の研究では，パッチクランプ法を用いて，ruthenium red はリアノジン受容体を，xestospongin C は IP_3 受容体を阻害することにより，大脳皮質体性感覚野錐体細胞の虚血による神経細胞死の過程が遅延することを明らかにした．

ストア作動性 Ca^{2+}チャネルは，小胞体の Ca^{2+}枯渇によって活性化される (Verkhratsky, 2005)．ストア作動性 Ca^{2+}チャネルの主要な分子実体として，Orai1

が同定されており(Feske *et al.*, 2006)，小胞体の Ca^{2+}枯渇を感知する stromal interacting molecule(STIM)との相互作用を介して活性化される(Cahalan, 2009)．こうした Ca^{2+}流入機構は，虚血時における大脳皮質錐体細胞の細胞死に関わっていることが示されており，ストア作動性 Ca^{2+}チャネルの活性化が，STIM のサブタイプである STIM2 に制御されていることが明らかにされている(Berna-Erro *et al.*, 2009)．このため，STIM2 が，脳虚血時における神経細胞死に関わっているものと考えられる．SKF96365 はストア作動性 Ca^{2+}チャネルを阻害するが，STIM は阻害しない．SKF96365 存在下においても，虚血負荷時，小胞体からの Ca^{2+}放出により小胞体の Ca^{2+}濃度は低下しているため，STIM が活性化していると考えられる．今回，パッチクランプ法を用いて，ストア作動性 Ca^{2+}チャネルを阻害することで，虚血時における大脳皮質体性感覚野錐体細胞の細胞死の過程を遅延することが，新たに明らかになった．分子生物学的手法や Ca^{2+}イメージング法で，STIM が虚血性神経細胞死に重要な役割を果たすと考えられている(Berna-Erro *et al.*, 2009)．本研究結果から，STIM の活性化それ自体よりも，STIM の活性化により開口するストア作動性 Ca^{2+}チャネルの活性化が虚血による神経細胞死に大きな影響を及ぼすことが新たに明らかになった．様々な条件で比較することにより，ストア作動性 Ca^{2+}チャネルが小胞体 Ca^{2+}動態に果たす役割が，さらに明らかになると考えられる．

結　論

本研究の結果から，リアノジン受容体や IP_3 受容体の活性化を介した小胞体からの Ca^{2+} 放出やその後に続くストア作動性 Ca^{2+} チャネルの活性化を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が，急峻脱分極電位の発生潜時や最大勾配に影響を与え，大脳皮質体性感覚野第 II/III 層錐体細胞における神経細胞死に深く関与していることが明らかになった．したがって，虚血負荷による神経細胞死に対し，小胞体からの Ca^{2+} 放出を抑制することにより，神経保護作用が生じる可能性が示唆された．

謝　辞

本稿を終えるに当たり，本研究を行う機会を与えていただき，終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔生理学教室 加藤隆史 教授に深甚なる謝意を表します．実験指導等に終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔生理学教室 豊田博紀 准教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究の円滑な進展のため，特別な御配慮御協力をいただきました大阪大学大学院歯学研究科口腔生理学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます．

文　献

Albrecht, J., Hanganu, I.L., Heck, N. & Luhmann, H.J. (2005) Oxygen and glucose deprivation induces major dysfunction in the somatosensory cortex of the newborn rat. *European Journal of Neuroscience*, **22**, 2295-2305.

Baylor, S.M., Hollingworth, S. & Marshall, M.W. (1989) EFFECTS OF INTRACELLULAR RUTHENIUM RED ON EXCITATION-CONTRACTION COUPLING IN INTACT FROG SKELETAL-MUSCLE FIBERS. *Journal of Physiology-London*, **408**, 617-635.

Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M.K., Stegner, D., Wultsch, T., Eilers, J., Meuth, S.G., Stoll, G. & Nieswandt, B. (2009) STIM2 regulates capacitive Ca^{2+} entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal*, **2**, ra67.

Bodalia, A., Li, H. & Jackson, M.F. (2013) Loss of endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis: contribution to neuronal cell death during cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin*, **34**, 49-59.

Brisson, C.D. & Andrew, R.D. (2012) A neuronal population in hypothalamus that dramatically resists acute ischemic injury compared to neocortex. *J Neurophysiol*, **108**, 419-430.

Bull, R., Finkelstein, J.P., Galvez, J., Sanchez, G., Donoso, P., Behrens, M.I. & Hidalgo, C. (2008) Ischemia enhances activation by Ca^{2+} and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. *J Neurosci*, **28**, 9463-9472.

Cahalan, M.D. (2009) STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nat Cell Biol*, **11**, 669-677.

Chen, T., Zhu, J., Zhang, C., Huo, K., Fei, Z. & Jiang, X.F. (2013) Protective Effects of SKF-96365, a Non-Specific Inhibitor of SOCE, against MPP+-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells: Potential Role of Homer1. *Plos One*, **8**.

Chen, X., Kintner, D.B., Luo, J., Baba, A., Matsuda, T. & Sun, D. (2008) Endoplasmic reticulum Ca^{2+} dysregulation and endoplasmic reticulum stress following in vitro neuronal ischemia: role of Na^{+}-K^{+}-Cl^{-} cotransporter. *J Neurochem*, **106**, 1563-1576.

Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M. & Kriegstein, A.R. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, **7**, 357-368.

Clapham, D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell*, **80**, 259-268.

Dubinsky, J.M. & Rothman, S.M. (1991) Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J Neurosci*, **11**, 2545-2551.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M. & Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, **441**, 179-185.

Fonnum, F., Paulsen, R.H., Fosse, V.M. & Engelsen, B. (1986) Synthesis and release of amino acid transmitters. *Adv Exp Med Biol*, **203**, 285-293.

Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.H. & Mak, D.O. (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol Rev*, **87**, 593-658.

Fujiwara, N., Higashi, H., Shimoji, K. & Yoshimura, M. (1987) Effects of hypoxia on rat hippocampal neurones in vitro. *J Physiol*, **384**, 131-151.

Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M. & Sorrentino, V. (1995) The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol*, **128**, 893-904.

Ginsberg, M.D. & Busto, R. (1989) Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, **20**, 1627-1642.

Hansen, A.J. (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev*, **65**, 101-148.

Hossmann, K.A. (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*, **36**, 557-565.

Kakizawa, S., Yamazawa, T., Chen, Y., Ito, A., Murayama, T., Oyamada, H., Kurebayashi, N., Sato, O., Watanabe, M., Mori, N., Oguchi, K., Sakurai, T., Takeshima, H., Saito, N. & Iino, M. (2012) Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J*, **31**, 417-428.

Kaminogo, M., Suyama, K., Ichikura, A., Onizuka, M. & Shibata, S. (1998) Anoxic depolarization determines ischemic brain injury. *Neurol Res*, **20**, 343-348.

Kawaguchi, Y. (1995) Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *Journal of Neuroscience*, **15**, 2638-2655.

Larsen, G.A., Skjellegrind, H.K., Moe, M.C., Vinje, M.L. & Berg-Johnsen, J. (2005) Endoplasmic reticulum dysfunction and Ca^{2+} deregulation in isolated CA1 neurons during oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res*, **30**, 651-659.

Lipton, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, **79**, 1431-1568.

Lipton, S.A. (1996) Similarity of neuronal cell injury and death in AIDS dementia and focal cerebral ischemia: potential treatment with NMDA open-channel blockers and nitric oxide-related species. *Brain Pathol*, **6**, 507-517.

Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, P.N. & Geiger, J.D. (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, **23**, 222-229.

Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benham, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E. & Rink, T.J. (1990) SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J*, **271**, 515-522.

Mitani, A., Yanase, H., Sakai, K., Wake, Y. & Kataoka, K. (1993) Origin of intracellular Ca^{2+} elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. *Brain Res*, **601**, 103-110.

Morishima, M. & Kawaguchi, Y. (2006) Recurrent connection patterns of corticostriatal pyramidal cells in frontal cortex. *J Neurosci*, **26**, 4394-4405.

Nakamura, T., Barbara, J.G., Nakamura, K. & Ross, W.N. (1999) Synergistic release of Ca2+ from IP3-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials. *Neuron*, **24**, 727-737.

Okamoto, K., Emura, N., Sato, H., Fukatsu, Y., Saito, M., Tanaka, C., Morita, Y., Nishimura, K., Kuramoto, E., Xu Yin, D., Furutani, K., Okazawa, M., Kurachi, Y., Kaneko, T., Maeda, Y., Yamashiro, T., Takada, K., Toyoda, H. & Kang, Y. (2016) The Possible Role of TASK Channels in Rank-Ordered Recruitment of Motoneurons in the Dorsolateral Part of the Trigeminal Motor Nucleus. *eNeuro*, **3**.

Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. & Nicotera, P. (1989) Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci*, **10**, 281-285.

Petravicz, J., Fiacco, T.A. & McCarthy, K.D. (2008) Loss of IP_3 receptor-dependent Ca^{2+} increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J Neurosci*, **28**, 4967-4973.

Power, J.M. & Sah, P. (2002) Nuclear calcium signaling evoked by cholinergic stimulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, **22**, 3454-3462.

Rothman, S.M. & Olney, J.W. (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol*, **19**, 105-111.

Santulli, G., Xie, W., Reiken, S.R. & Marks, A.R. (2015) Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 11389-11394.

Sattler, R. & Tymianski, M. (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol*, **24**, 107-129.

Szydlowska, K. & Tymianski, M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, **47**, 122-129.

Tanaka, E., Yamamoto, S., Kudo, Y., Mihara, S. & Higashi, H. (1997) Mechanisms underlying the rapid depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J Neurophysiol*, **78**, 891-902.

Varnai, P., Hunyady, L. & Balla, T. (2009) STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci*, **30**, 118-128.

Vergun, O., Keelan, J., Khodorov, B.I. & Duchen, M.R. (1999) Glutamate-induced mitochondrial depolarisation and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol*, **519**, **2**, 451-466.

Verkhratsky, A. (2005) Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev*, **85**, 201-279.

Xu, L., Tripathy, A., Pasek, D.A. & Meissner, G. (1999) Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca2+ release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 32680-32691.

Yamada, N., Makino, Y., Clark, R.A., Pearson, D.W., Mattei, M.G., Guenet, J.L., Ohama, E., Fujino, I., Miyawaki, A., Furuichi, T. & et al. (1994) Human inositol 1,4,5-trisphosphate type-1 receptor, $InsP_3R1$: structure, function, regulation of expression and chromosomal localization. *Biochem J*, **302**, **3**, 781-790.

Yamamoto, S., Tanaka, E., Shoji, Y., Kudo, Y., Inokuchi, H. & Higashi, H. (1997) Factors that reverse the persistent depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, **78**, 903-911.

Zhao, M.G., Toyoda, H., Lee, Y.S., Wu, L.J., Ko, S.W., Zhang, X.H., Jia, Y., Shum, F., Xu, H., Li, B.M., Kaang, B.K. & Zhuo, M. (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*, **47**, 859-872.

図表の説明

図 1　Control 条件下における虚血負荷に対する膜電位応答と計測項目

A. Control 条件下における虚血負荷に対する膜電位応答．発生潜時は，無酸素・無グルコース溶液の投与開始時点から最大勾配を示す時点までの時間を計測した．最大膜電位は，最大勾配を示す時点から 4 分後までの区間において，最も大きい膜電位を計測した．振幅は，静止膜電位から最大膜電位までの電位を計測した．

B. 図 A において，赤点線の四角で囲まれた部分を拡大したトレースを示す．最大勾配は，全測定区間において 10 ms 間隔ごとの勾配を求め，その最大値から求めた．最大勾配膜電位は，最大勾配を示す時点における膜電位を計測した．

図 2　大脳皮質体性感覚野第 II/III 層に位置する錐体細胞と抑制性神経細胞における発火および形態学的特性

A. 1 秒間の過分極性電流パルス(–220 pA)および脱分極性電流パルス(920 pA)に対する膜電位応答．発火発生の時間間隔が増加していた．つまり，発火の順応が認められたため，錐体細胞であることが示唆される．バイオサイチンによって標識された記録細胞の染色像において，細胞体は錐体形を示し，尖端樹状突起は大

脳皮質表層へ向かって伸びていることが確認される．

B. 1 秒間の過分極性電流パルス(–220 pA)および脱分極性電流パルス(1000 pA)に対する膜電位応答．高頻度の発火を示し，発火の順応が認められないため，fast-spiking 抑制性神経細胞であることが示唆される．バイオサイチンによって標識された記録細胞の染色像において，軸索が細胞体をバスケット状に囲んでいる様子が観察される．

図 3　虚血負荷後のバイオサイチン染色像

A. 急峻脱分極電位発生以前(虚血負荷 5 分後)では，細胞体や樹状突起に形態変化が認められない．

B. 急峻脱分極電位発生直後(最大勾配膜電位から 0.5 分後)では細胞体や樹状突起の染色性が低下している．

図 4　虚血負荷に対する膜電位応答

A. Cont 群．B. RR 群．C. Xest C 群．D. RR+Xest C 群．E. SKF 群．

A–E 右図に，A–E それぞれの赤点線の四角で囲まれた部分を拡大したトレースを示す．虚血負荷前の静止膜電位の平均と 0 mV を点線で示す．

図 5　静止膜電位，最大勾配膜電位，最大膜電位の変化

A．Cont 群．B. RR 群．C. Xest C 群．D. RR+Xest C 群．E. SKF 群.

図 6　各条件下における発生潜時の比較

RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群では，Cont 群と比較して，有意に延長している．†：$P < 0.05$, One-way ANOVA post hoc Fisher's LSD test.

図 7　各条件下における最大勾配膜電位の比較

5 群の間に有意差は認められない.

図 8　各条件下における最大勾配の比較

RR 群，Xest C 群，RR+Xest C 群，SKF 群では，Cont 群と比較して，有意に減少している．RR+Xest C 群では，RR 群および Xest C 群と比較して，有意に減少している．†：$P < 0.05$, One-way ANOVA post hoc Fisher's LSD test.

図 9　各条件下における最大膜電位の比較

SKF 群では, Cont 群と比較して, 有意に深い膜電位を示している．SKF 群では,

R 与群および RR+Xest C 群と比較して，有意に深い膜電位を示している．†：$P < 0.05$, One-way ANOVA post hoc Fisher's LSD test.

図 10　各条件下における振幅の比較

5 群の間に有意差は認められない.

図 11　虚血負荷による神経細胞死のメカニズム

虚血負荷直後，Na^+-K^+ポンプの機能低下による細胞外 K^+濃度上昇や細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じる(1)．また，グルタミン酸による NMDA 受容体の活性化に伴って，細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が生じる(2)．さらには，リアノジン受容体および IP_3 受容体が活性化され，小胞体から Ca^{2+}の放出が生じる(3)．そして, 小胞体内の Ca^{2+}が枯渇して, ストア作動性 Ca^{2+}チャネルが活性化される(4).

Na^+-K^+ポンプの機能が破綻すると，急峻脱分極が発生する．急峻脱分極発生時, Ca^{2+}依存性酵素の活性化により，非選択的イオン(Na^+，Ca^{2+}，Cl^-等)の透過性上昇が生じ(5)，細胞の膨化が起こる(6)．錐体細胞の膜電位が消失し，細胞膜に不可逆的変化(神経細胞死)が引き起こされ，細胞膜が破壊される(7).

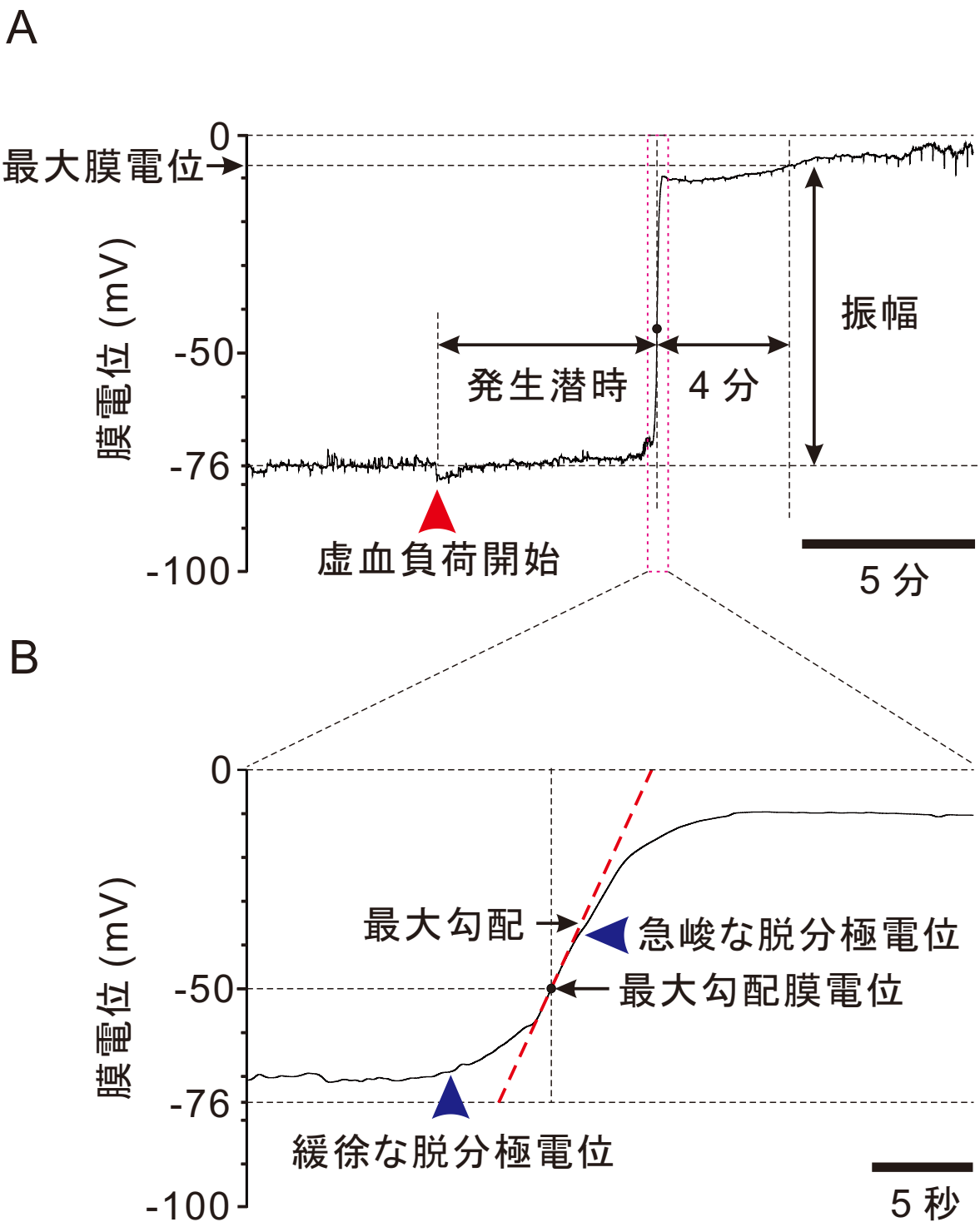
A
0
最大膜電位
膜電位 (mV)
-50
-76
-100
発生潜時
4 分
振幅
虚血負荷開始
5 分
B
0
膜電位 (mV)
-50
-76
-100
最大勾配
急峻な脱分極電位
最大勾配膜電位
緩徐な脱分極電位
5 秒

図 1

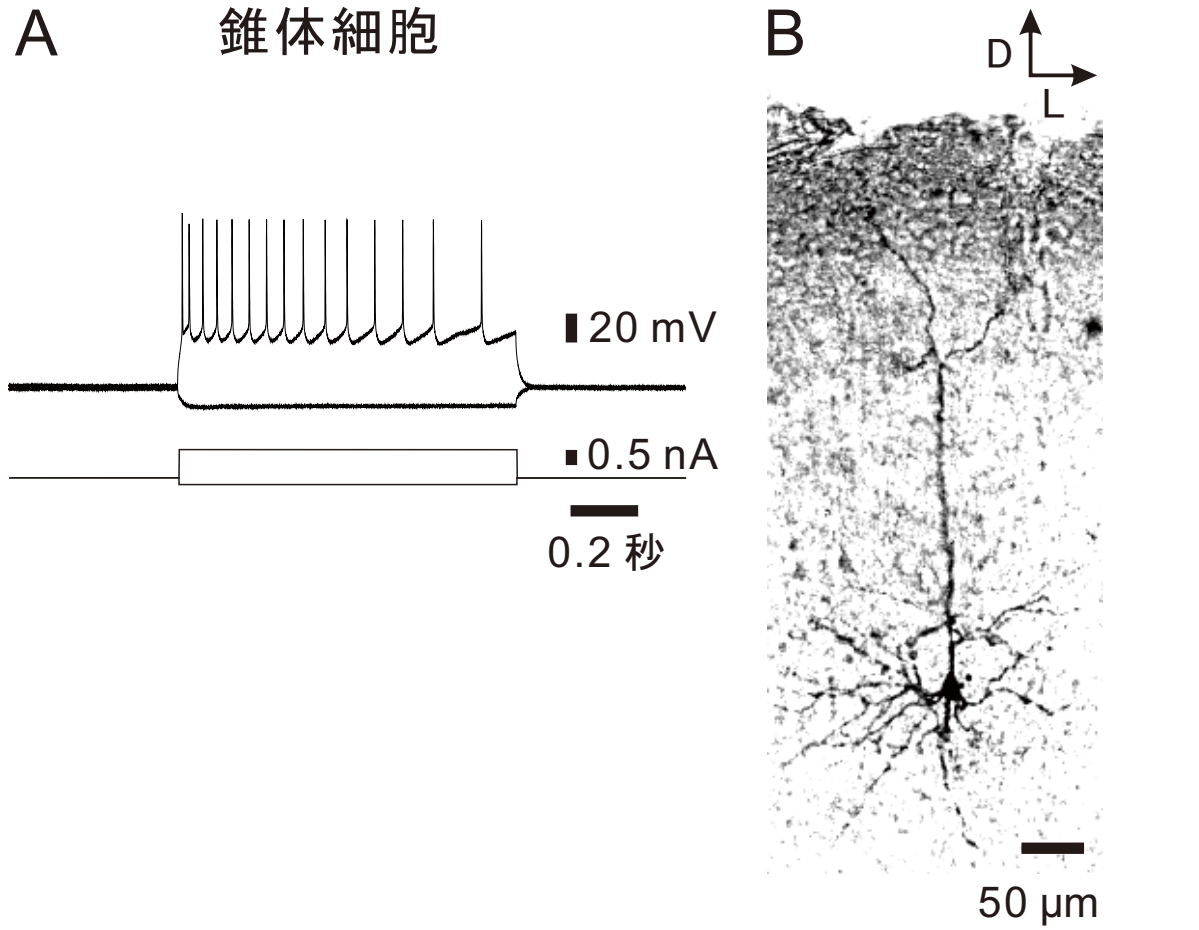
A
錐体細胞
20 mV
0.5 nA
0.2 秒
B
D
L
50 μm
C
Fast-spiking
抑制性神経細胞
20 mV
0.5 pA
0.2 秒
D
D
L
50 μm

図 2

A 急峻脱分極前　　B 急峻脱分極直後

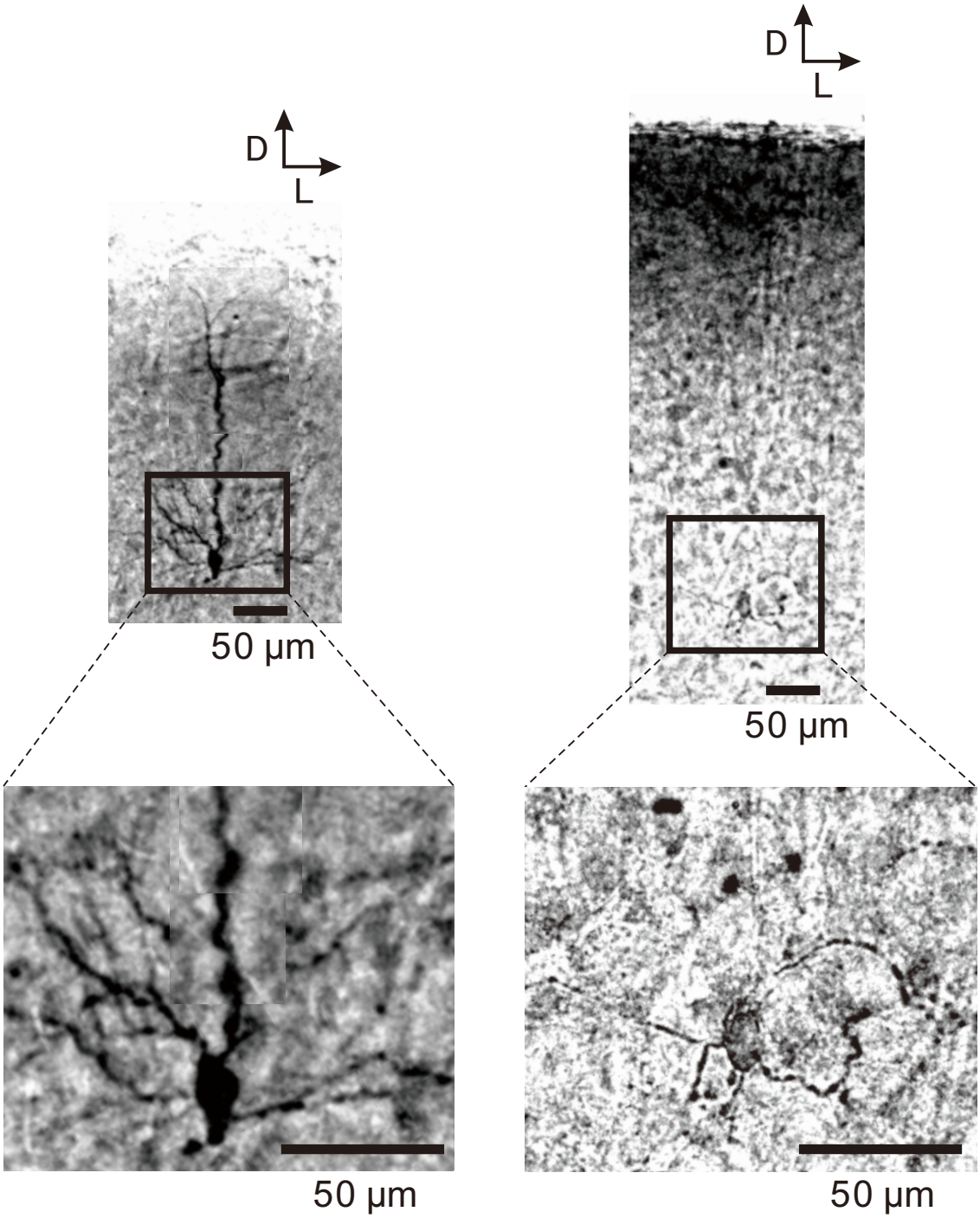

図 3

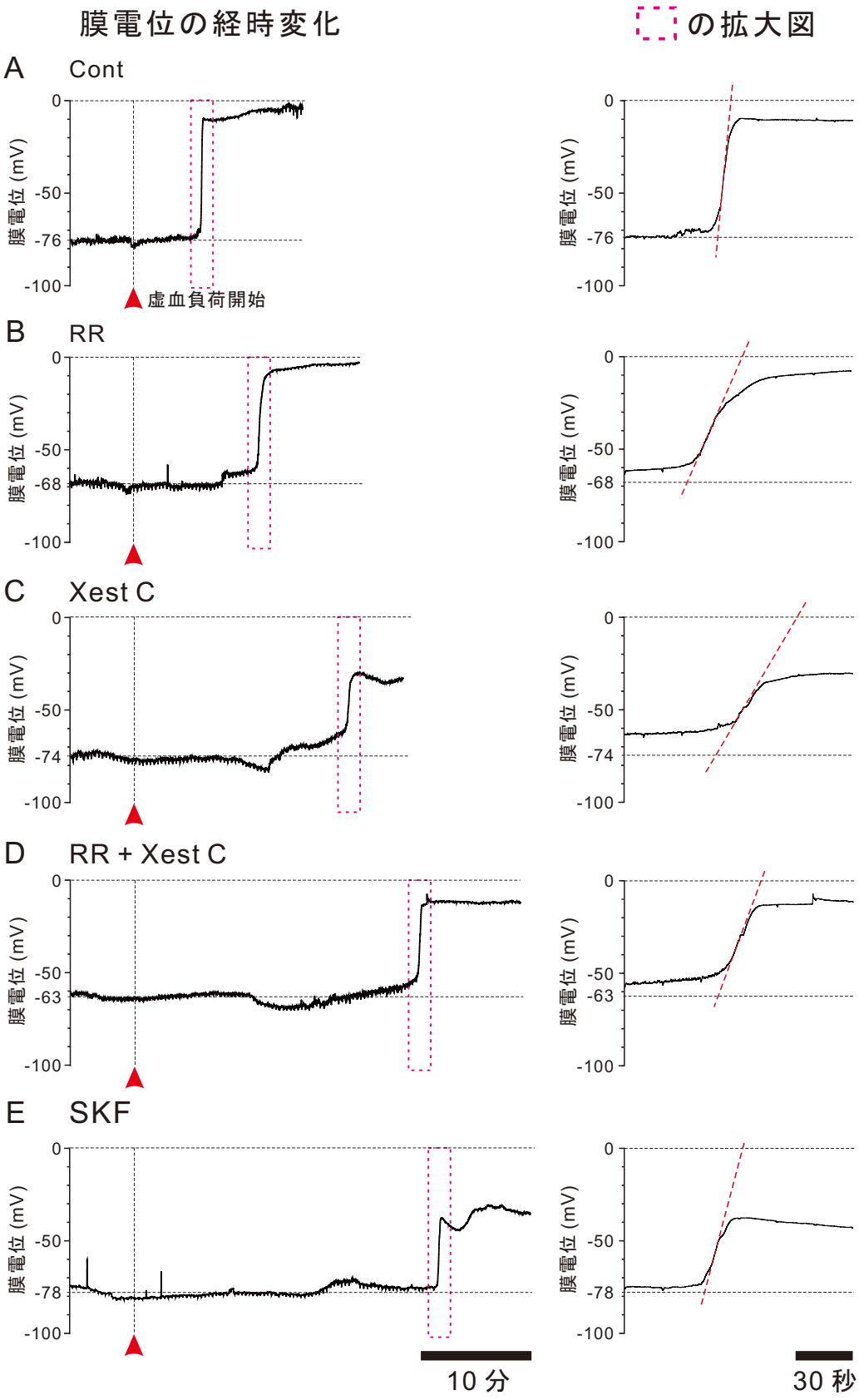
膜電位の経時変化
の拡大図
A
Cont
膜電位 (mV)
0
-50
-76
-100
虚血負荷開始
B
RR
-68
C
Xest C
-74
D
RR + Xest C
-63
E
SKF
-78
10 分
30 秒

図 4

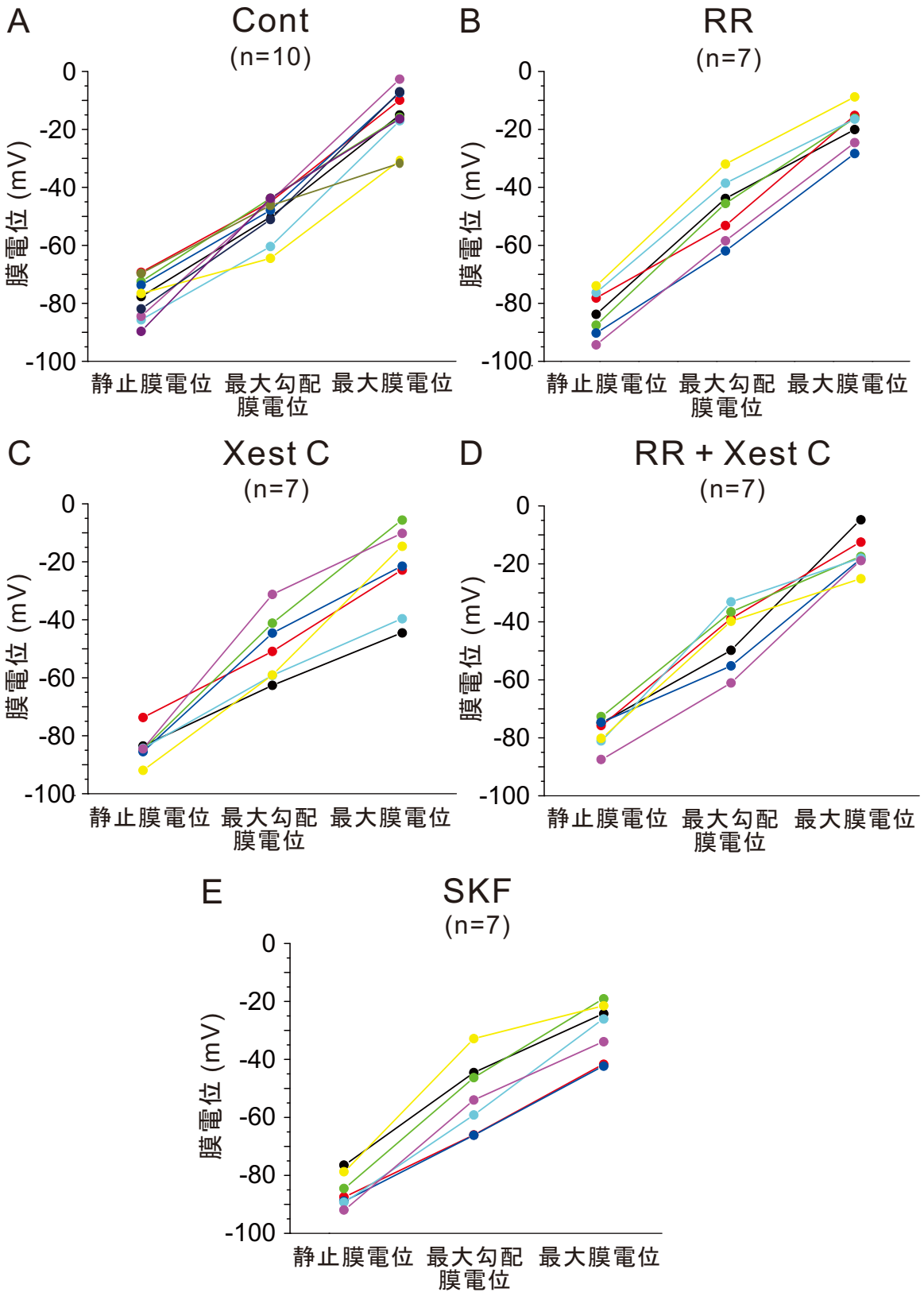
A
Cont
(n=10)
B
RR
(n=7)
C
Xest C
(n=7)
D
RR + Xest C
(n=7)
E
SKF
(n=7)
膜電位 (mV)
0
-20
-40
-60
-80
-100
静止膜電位
最大勾配
膜電位
最大膜電位

図 5

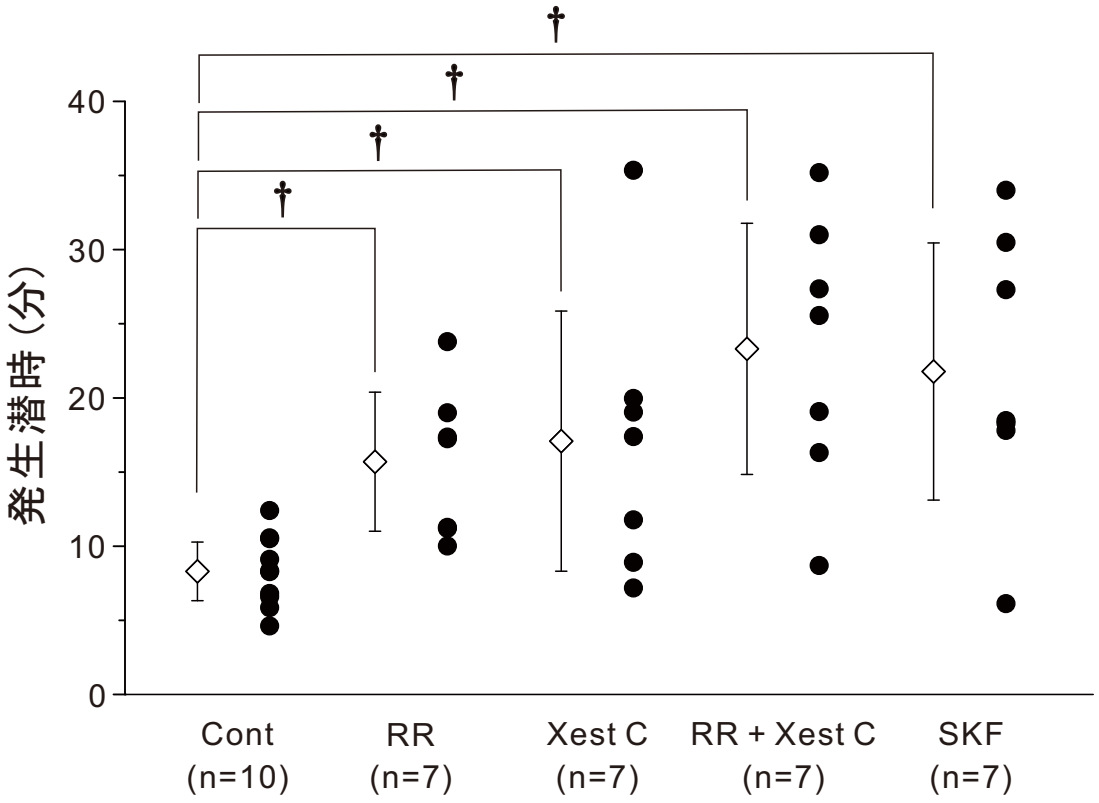

図 6

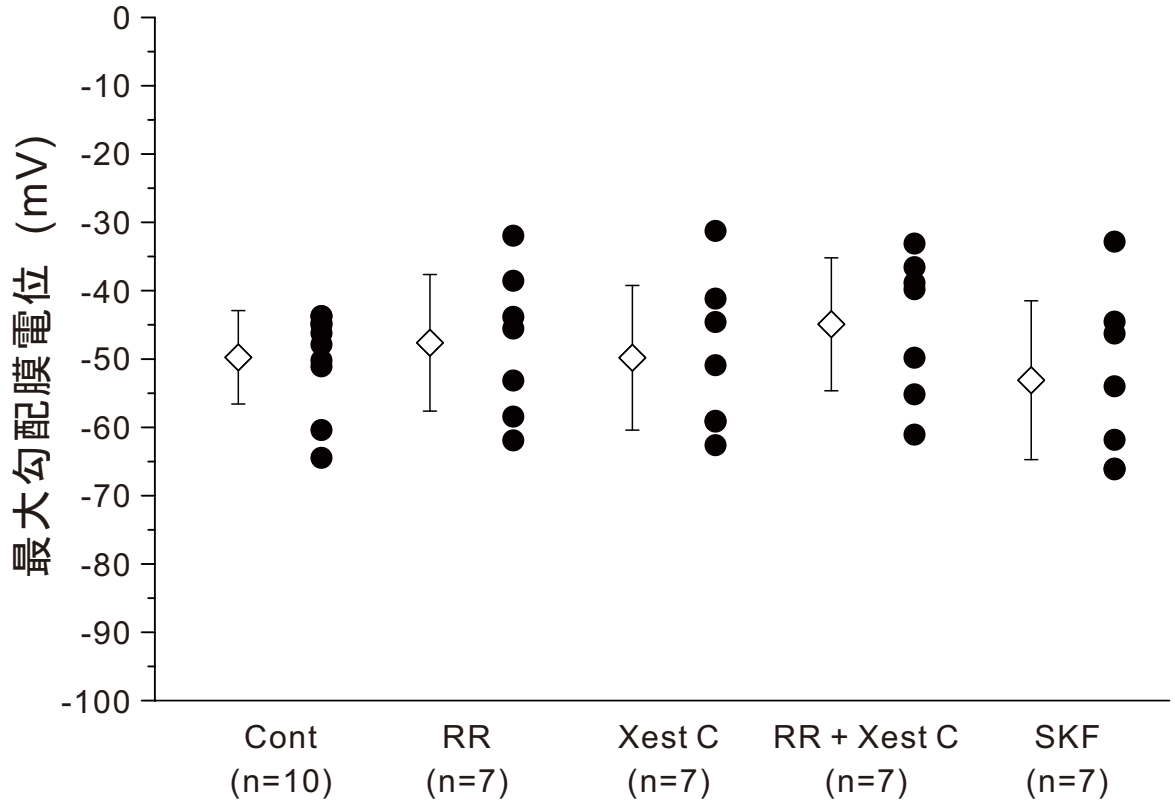
最大勾配膜電位（mV）
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
-100
Cont
(n=10)
RR
(n=7)
Xest C
(n=7)
RR + Xest C
(n=7)
SKF
(n=7)

図 7

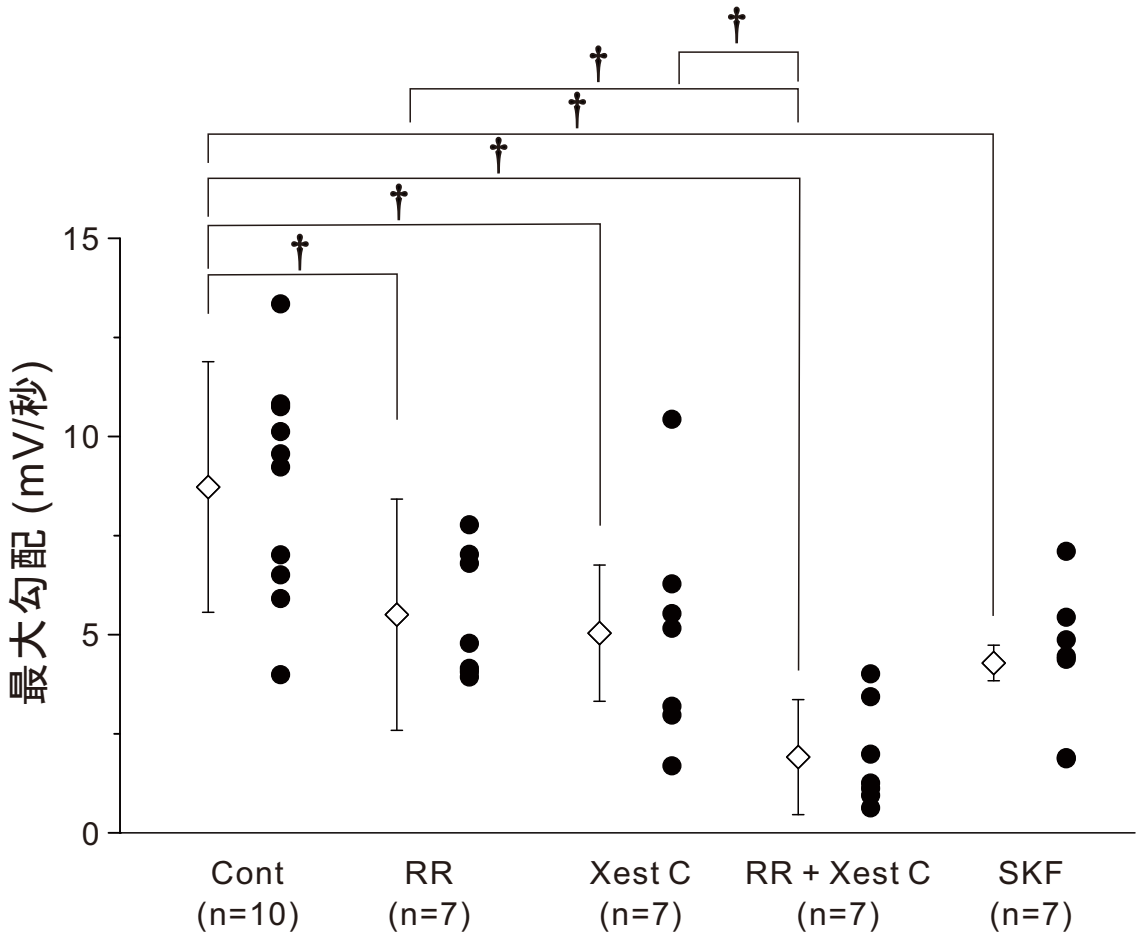

図 8

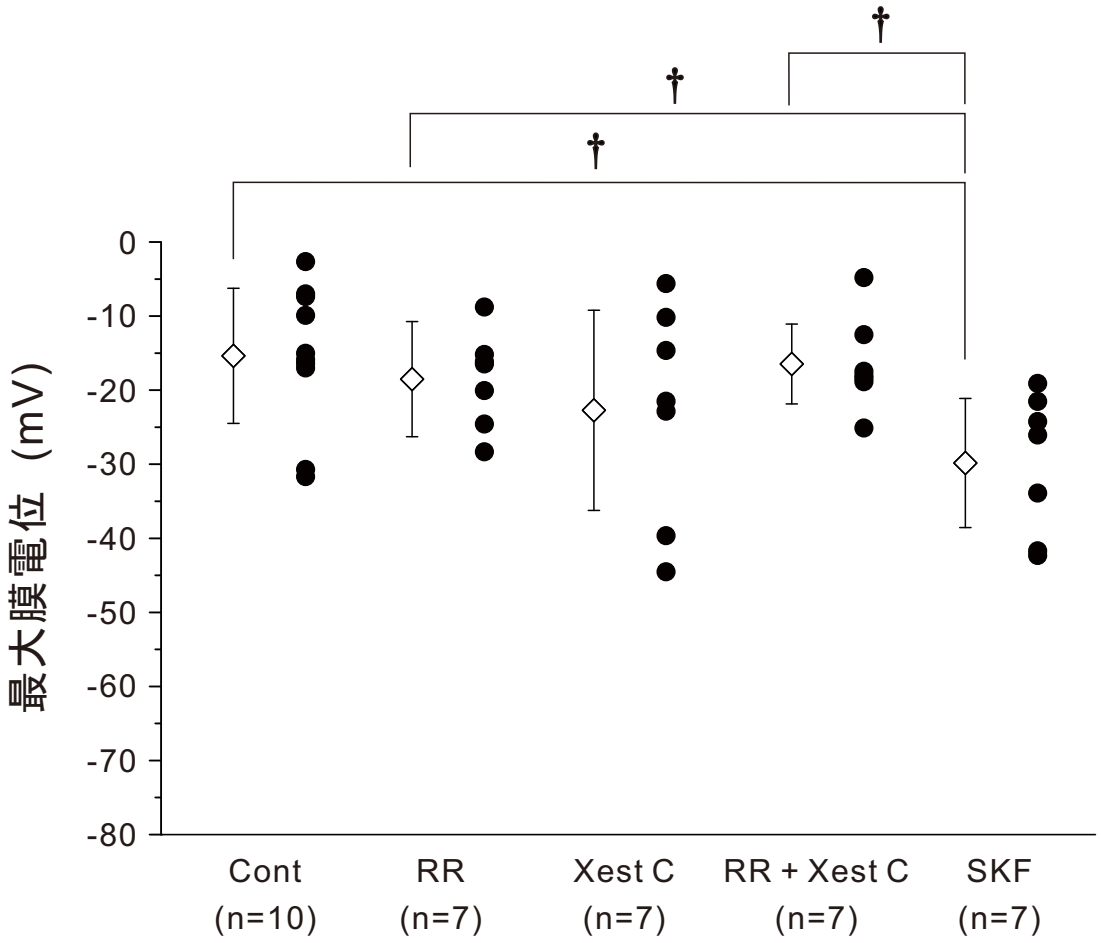
†
†
†
最大膜電位（mV）
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
Cont
(n=10)
RR
(n=7)
Xest C
(n=7)
RR + Xest C
(n=7)
SKF
(n=7)

図 9

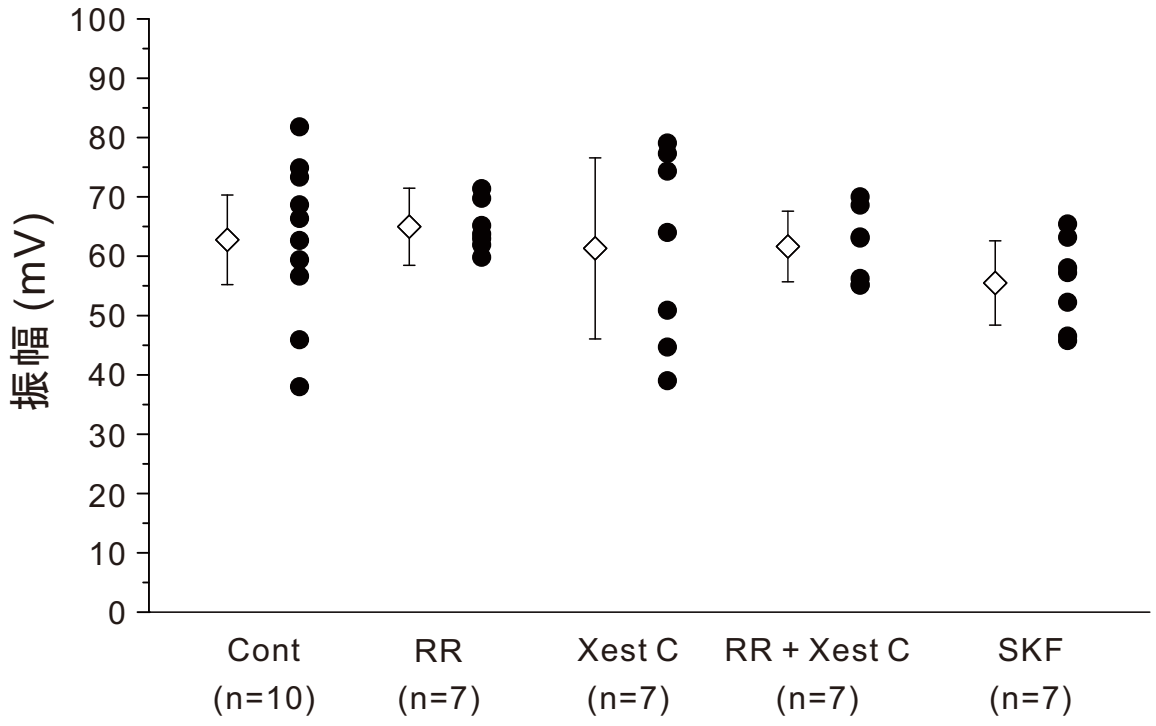
振幅 (mV)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Cont
(n=10)
RR
(n=7)
Xest C
(n=7)
RR + Xest C
(n=7)
SKF
(n=7)

図 10

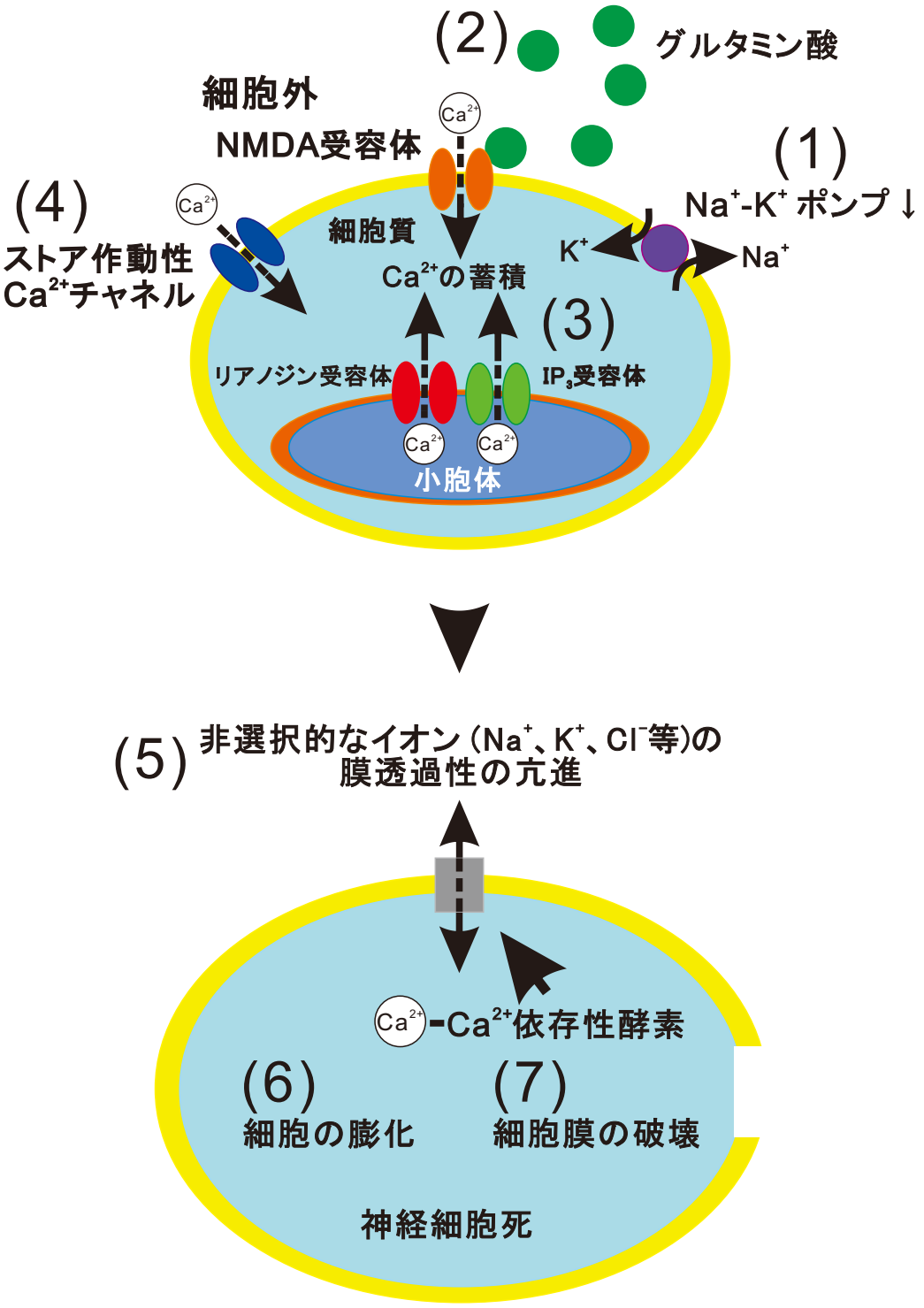
(2)
グルタミン酸
細胞外
NMDA受容体
Ca2+
(1)
Na+-K+ ポンプ↓
(4)
ストア作動性
Ca2+チャネル
細胞質
K+
Na+
Ca2+の蓄積
(3)
リアノジン受容体
IP3受容体
小胞体
(5) 非選択的なイオン（Na+、K+、Cl-等）の
膜透過性の亢進
Ca2+-Ca2+依存性酵素
(6)
細胞の膨化
(7)
細胞膜の破壊
神経細胞死

図 11