

# 目次

## はじめに

緒言	6
略語	14

## 第1章 中大脳動脈結紮術による神経組織障害とミノキシジル投与に伴う抑制効果の検討

1.1.	序文	15
1.2.	方法	16
1.2.1.	試薬	16
1.2.2.	動物	16
1.2.3.	中大脳動脈結紮術	16
1.2.4.	TTC 染色	17
1.2.5.	自発運動量測定・生存曲線	17
1.2.6.	ニッスル染色	17
1.2.7.	データ解析	17
1.3.	結果	
1.3.1.	ミノキシジルによる虚血障害後の 細胞内呼吸活性低下に対する抑制作用	18
1.3.2.	中大脳動脈結紮術後 24 時間における自発運動量変化	20
1.3.3.	中大脳動脈結紮術 28 日後の生存曲線	21
1.3.4.	中大脳動脈結紮術 28 日後のニッスル染色像	21
1.4.	考察	23

## 第2章 初代培養神経細胞における興奮性毒性に対するミノキシジルの抑制効果

2.1.	序文	24
------	----	----

2.2.	方法	24
2.2.1.	試薬	25
2.2.2.	動物	25
2.2.3.	初代大脳皮質神経細胞培養	25
2.2.4.	逆転写 PCR (RT-PCR)	25
2.2.5.	蛍光指示薬によるミトコンドリア検出と膜電位変動解析	25
2.2.6.	K <sup>+</sup> チャンネル開口と細胞内 K <sup>+</sup> レベル検出	26
2.2.7.	MTT 還元能の測定 (MTT Assay)	26
2.2.8.	イムノブロット法	26
2.2.9.	免疫化学染色法	27
2.2.10.	データ解析	27
2.3.	結果	28
2.3.1.	大脳皮質神経細胞における K <sub>ATP</sub> チャンネル構成サブユニット遺伝子発現	28
2.3.2.	DiSC3(5)を用いたミトコンドリア膜電位変動の測定	29
2.3.3.	ミノキシジルによるアポトーシスシグナルの抑制	32
2.3.4.	ミノキシジルによるカスパーゼ非依存性細胞死経路への影響	34
2.3.5.	ミノキシジルによる細胞内 K <sup>+</sup> レベル減少作用	36
2.4.	考察	37
<b>第3章 ミノキシジルによる血圧低下作用が脳保護作用を示した可能性に関する検討</b>		
3.1.	序文	40
3.2.	方法	41
3.2.1.	動物	41
3.2.2.	試薬	42
3.2.3.	血圧測定	42
3.2.4.	MCAO	42
3.2.5.	TTC 染色	42
3.2.6.	データ解析	42
3.3.	結果	42
3.3.1.	各薬物による尾動脈血圧降下作用	42

3.3.2.	各薬物投与群における心機能変化	43
3.3.3.	血圧降下作用と梗塞巣減少作用の相関性	46
3.4.	考察	46
<b>第4章 K<sub>ATP</sub> チャンネル開口阻害薬によるミノキシジルの神経保護作用に対する効果</b>		
4.1.	序文	48
4.2.	方法	48
4.2.1.	試薬	48
4.2.2.	動物	49
4.2.3.	MCAO	49
4.2.4.	TTC 染色	49
4.2.5.	初代大脳皮質神経細胞培養	49
4.2.6.	K <sup>+</sup> チャンネル開口と細胞内 K <sup>+</sup> レベルの測定	49
4.2.7.	MTT 還元能の測定 (MTT Assay)	49
4.2.8.	蛍光指示薬による細胞内 Ca <sup>2+</sup> レベル測定	49
4.2.9.	データ解析	49
4.3.	結果	50
4.3.1.	ミノキシジルによる NMDA 受容体作動に伴う Ca <sup>2+</sup> 流入に対する影響	50
4.3.2.	グリベンクラミドによるミノキシジルの神経保護作用への影響	51
4.3.3.	培養細胞におけるカリウムチャンネル開口頻度および細胞内カリ ウムレベル変動に対するグリベンクラミドの影響	52
4.3.4.	培養細胞における細胞膜およびミトコンドリア K <sub>ATP</sub> チャンネル 阻害薬による、NMDA 誘発性神経細胞障害に対する影響	52
4.3.5.	培養細胞における細胞膜およびミトコンドリア K <sub>ATP</sub> チャンネル 阻害薬による、NMDA 誘発性神経細胞障害に対する影響	55
4.4.	考察	56
おわりに		58
結語		60

謝辞	61
引用文献	62

# はじめに

## 緒言

脳血管疾患は罹患数の多い疾患のひとつである。脳梗塞、脳虚血、脳内出血を一度起こすと重篤な後遺症を残す可能性が高いが、残念ながら予防できていない (1-7)。我が国における脳血管疾患患者数はおよそ 120 万人にのぼる。また、辛うじて一命を取り留めた患者の多くに運動麻痺や認知機能障害などの後遺症が認められる。脳血管疾患は通常片側に発症し、どの領域の神経細胞が脱落するかで症状や予後が異なる。例えば錐体外路系を担う領域が障害されると片麻痺、下半身不随等の後遺症が身体に残る。脳梗塞及び脳虚血は、血流の途絶であり脳内出血とは異なるが、再灌流までの期間、低酸素や低栄養等が原因で血管内皮細胞が傷害され、したがって再灌流後はその物理的的刺激が原因で血管が破綻し、出血してしまうことがある (8)。低酸素や低栄養状態は、酸化ストレスを蓄積し、中枢神経系の破壊へと繋がる (9)。事実、エダラボンはフリーラジカルスカベンジャーとして虚血障害に対して劇的な治療効果を示し (10)、脳梗塞急性期に伴う神経症候、日常生活動作障害及び機能障害の改善に適応がある。一方フリーラジカルは血管内皮細胞をも傷害するため、エダラボンは内皮細胞を傷害から守り、血管壁を破綻から守っている (Fig.1)。

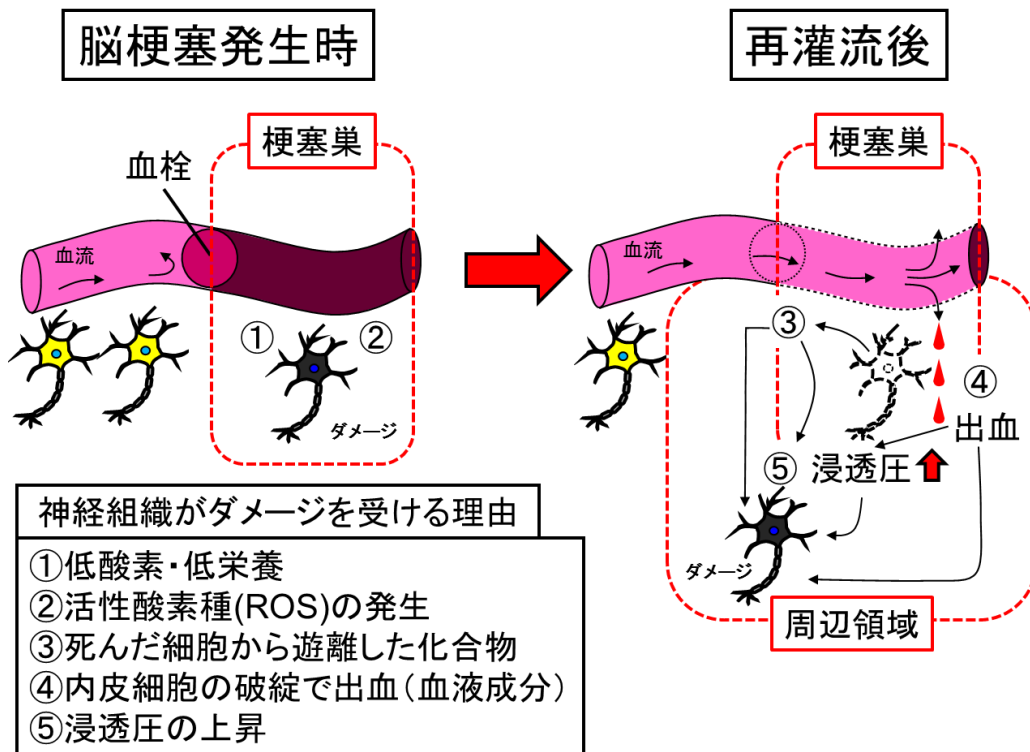
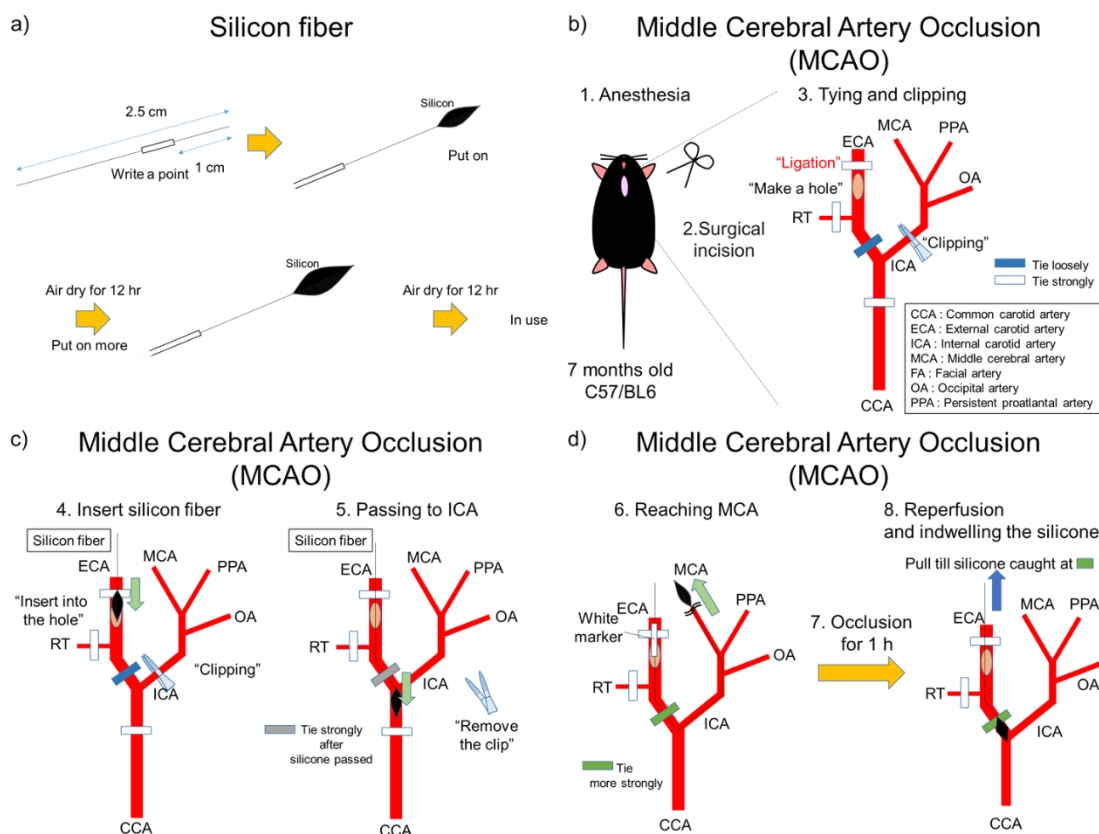


Fig.1. 脳梗塞発症時の神経組織のダメージが梗塞巣だけでなく周辺領域へ影響する機構

脳内出血は、血漿に含まれるさまざまな化合物が神経細胞に曝露されることに直結し、なかでもグルタミン酸が神経を刺激し神経変性を引き起こす可能性がある (11)。脳血管疾患を研究するためのモデル動物作成法には、げっ歯類に対する中大脳動脈結紮術がある (Fig.2) (12)。



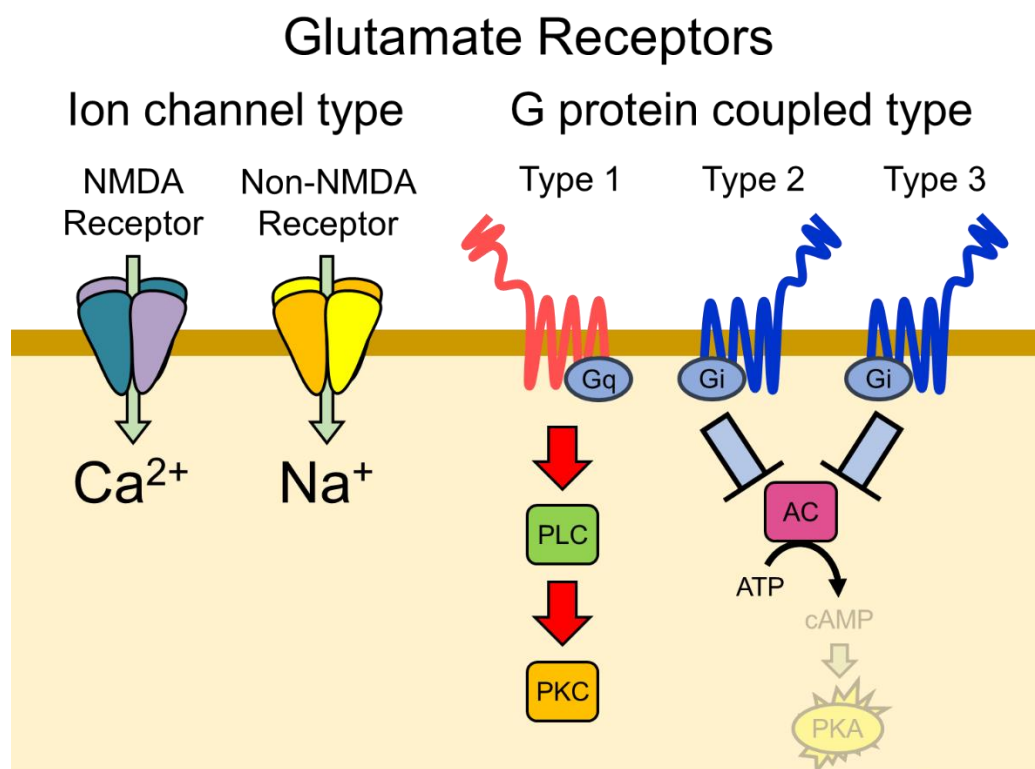
**Fig.2. 本研究で使用した中大脳動脈結紮術 (middle cerebral artery occlusion : MCAO)**

A) 0.05-0.069 mm の太さの糸を 2.5 cm 準備し、先端から 1 cm のところに修正液で白い印を付ける。糸の先端に長さ 400  $\mu$ m、太さ 200  $\mu$ m のシリコンを 2 回に分けながら付着させ、シリコンファイバーとする。

B-D) 1) 麻酔下においたマウス (C57/BL6) 頸部を消毒した後、2) 正中線で切開して左総頸動脈を露出する。3) 縫合糸を用いて、遠位外頸動脈 (ECA) を結紮し、この結紮点から近位で分岐した血管 (RT) を結紮した。次に総頸動脈 (CCA) を一時的に結紮して心臓からの血流を止め、総頸動脈分岐点より遠位にある内頸動脈 (ICA) をクリップにより一時的に血流を遮断して、血液の逆流を防いだ。4) 遠位外頸動脈結紮点より少し近位に「穴」をあけ、シリコンファイバーを挿入する。5) シリコンファイバーは、外頸動脈より、総頸動脈へ誘導された後、近位外頸動脈を緩く結紮する。内頸動脈上に留置されたクリップを取り除き、内頸動脈へシリコンファイバーを誘導する。6) シリコンファイバーはさらに挿入し、遠位頸動脈上の「穴」より 9-10 mm 挿入することで、ウィリス脳動脈輪にある、中大脳動脈に到達させ、シリコンファイバーの先端のシリコンがこれを閉塞する。ここで近位外頸動脈を十分強く結紮し、1 時間 (または適当な期間) 閉塞状態を継続する。7) 血液の再灌流は、血管を閉塞しているシリコンファイバーがついた糸を引き、シリコンファイバーが中大脳動脈から近位外頸動脈結紮部位まで後退させる。したがって、シリコンファイバーは留置する。術終了後、縫合糸で頸部切開部を閉じる。

中大脳動脈結紮術は脳血管疾患に関する研究で最もポピュラーな技術であるだけでなく、神経変性を引き起こすモデルとしても有用である。中大脳動脈結紮術は虚血によって、物理的活性酸素量の上昇を起因とした神経細胞障害、もしくは血液成分による刺激によって神経伝達物質であるグルタミン酸の放出によって生じる神経変性の二つのメカニズムによって細胞障害を来す。そのため、中大脳動脈結紮術処置マウスは大腦皮質における障害領域だけでなく、その周辺領域（ペナンプラ）も確認することができる（8）。ペナンプラにおける神経細胞死は、グルタミン酸受容体を遮断することで抑制されることから、グルタミン酸が責任領域内の死細胞から、もしくは破綻した血管から放出されることで誘導され傷害をおこすと考えられる（13）。

グルタミン酸受容体には、速い伝達を担うイオンチャネル型グルタミン酸受容体と G タンパク質と共役することで遅い伝達を担う G タンパク質共役型グルタミン酸受容体がある（14）。イオンチャネル型グルタミン酸受容体はさらに、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体と non-NMDA 受容体に分類される。このうち、NMDA 受容体は  $Ca^{2+}$  を流入させることによって、non-NMDA 受容体は  $Na^{+}$  を流入させることによって神経細胞を脱分極させる（Fig.3）。



**Fig.3. グルタミン酸受容体のタイプ**

イオンチャネル型は  $Ca^{2+}$ 透過性の NMDA 受容体と  $Na^{+}$ 透過性の non-NMDA 受容体に分類される。G タンパク質共役型グルタミン酸受容体は、3つのタイプが存在する。このうち、タイプ1のみ Gq タンパク質に共役して C キナーゼ（PKC）の活性化に関与する。タイプ2及び3は Gi タンパク質と共役して A キナーゼ（PKA）活性抑制に関与する。

神経細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加は細胞膜の膜電位を興奮するだけでなく、細胞レベルの記憶・学習の基盤と考えられている未熟期における神経回路形成やシナプス可塑性の形成に関わる細胞内酵素を活性化させる (15, 16)。しかしながら、過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、カスパーゼ経路を介したアポトーシスを誘導する (Fig.4) (17)。アポトーシスは Fas、腫瘍壊死因子 (TNF)  $\alpha$ 、紫外線 (UV)、 $\gamma$  線や成長因子の欠損などの様々な要因で引き起こされる (18, 19)。ミトコンドリア脱分極も、アポトーシス誘導に関与し、シトクロム c 放出に続いてカスパーゼ 9、さらにカスパーゼ 3 の活性化を介して細胞死を誘導する (Fig.4) (20)。

アポトーシスはカスパーゼ非依存的な因子によっても引き起こされる。CED/ CPP32 はミトコンドリアの膜電位消失に伴うシトクロム c 遊離を引き金として活性型となる (21)。一方、アポトーシス誘導因子 (AIF) はミトコンドリア内膜に局在するタンパク質であり、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入や活性酸素種 (ROS) の産生に伴い、ミトコンドリアから遊離する。AIF は細胞質においては、ROS の産生を促進することで、この経路を正のフィードバックを行い (22)、核内に移行した AIF は DNA に直接結合することで、核の断片化を促進し、アポトーシスを誘導する。

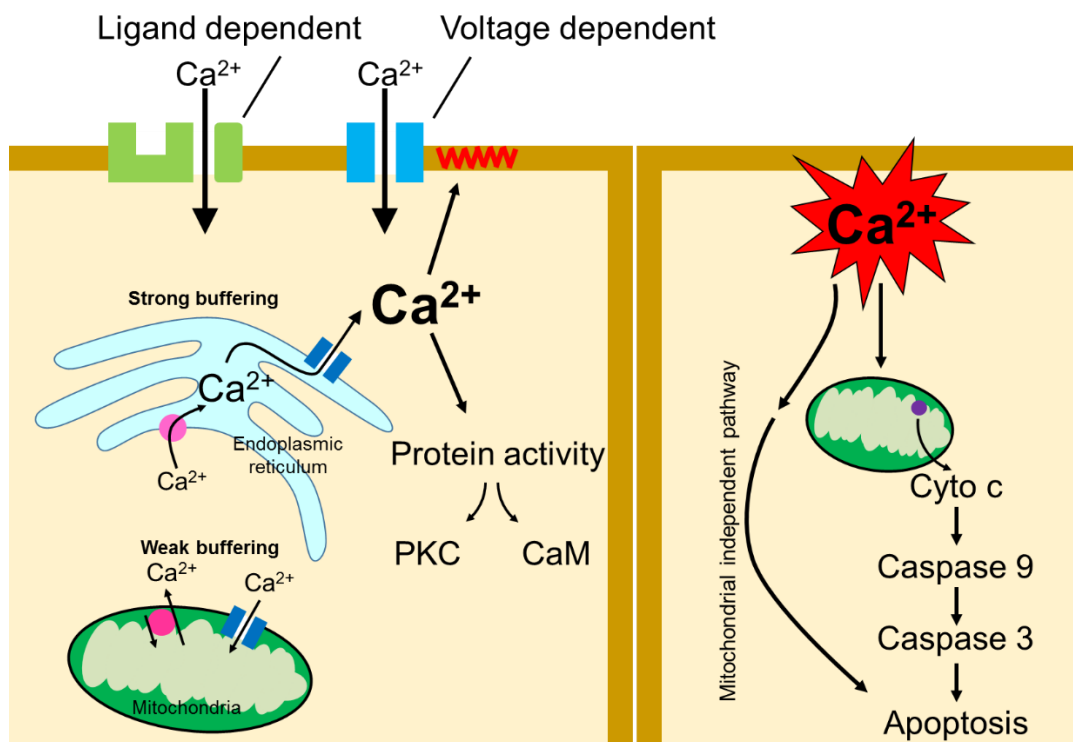
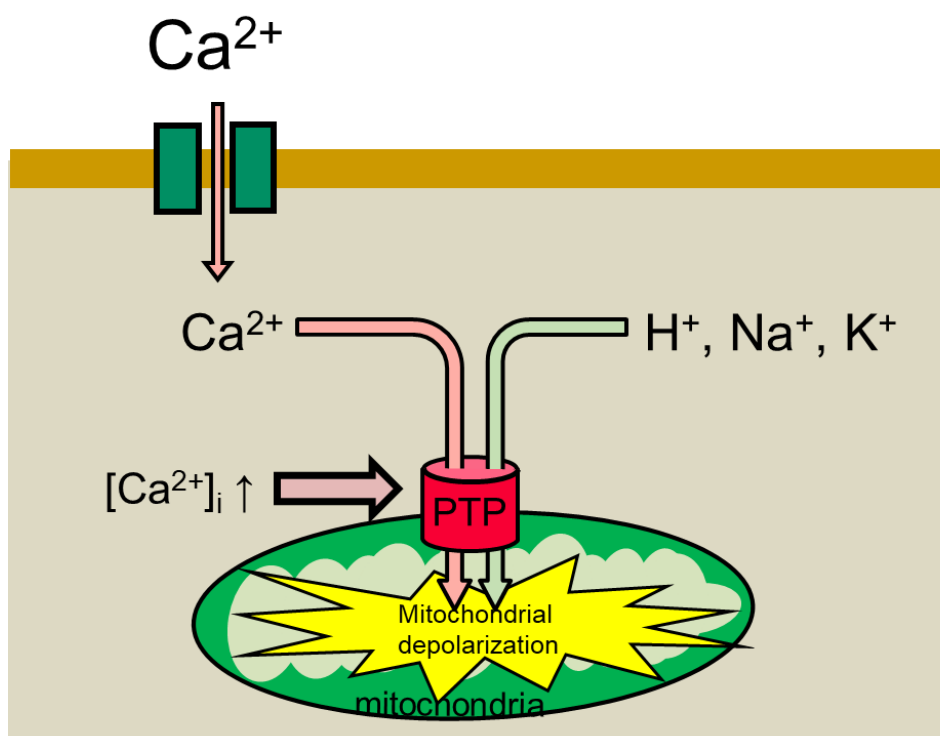


Fig.4.  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルとアポトーシス



ミトコンドリア脱分極を誘発する薬物は脱共役剤と呼ばれ、2,1-ジニトロフェノール (DNP)、カルボニルシアニド *m*-クロロフェニルヒドラジン (CCCP)、カルボニルシアニド-*p*-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP) 及びバリノマイシン等がある。これらの化合物はミトコンドリア内膜の内外に形成されているプロトン勾配を破綻することによって脱分極を誘導する。ミトコンドリアの内膜は生理的にも脱分極を起こすことがある。例えば、脱共役タンパク質や膜透過性遷移孔 (PTP) の開口は、ミトコンドリアにおけるイオン勾配を消失させる内因性機構である (23, 24)。PTP は細胞質基質における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が引き金となって開口する。PTP 開口は  $\text{Ca}^{2+}$  だけでなく、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等の陽イオンを細胞質基質からミトコンドリアマトリックスへ流入させる結果、内膜の膜電位を消失し、脱分極させる (Fig.5) (24)。



PTP: mitochondrial permeability transition pore

Fig.5. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に伴う PTP 開口とミトコンドリア脱分極

我々は、蛍光指示薬である 3,3-ジプロピルチアジカルボシアニンイオダイド[DiSC<sub>3</sub>(5)]を用いて、PTP 開口に伴うミトコンドリア脱分極を測定してきた (25, 26)。神経細胞に NMDA を処置すると、Ca<sup>2+</sup>チャネル開口に伴う神経細胞死が観察されるが、PTP 開口に伴う一過性ミトコンドリア膜電位の脱分極も同様に観察された。ここに、γ-アミノ酪酸 (GABA)<sub>B</sub> 受容体作動薬バクロフェンを前処置しておくとも PTP 開口及び細胞死が抑制された。解析の結果、これらの現象は、ともに G タンパク質共役型 K<sup>+</sup>チャネルの開口を介していることが判明した (22)。細胞内 K<sup>+</sup>レベルは Na<sup>+</sup>ポンプによって、細胞外よりも細胞内に高濃度に調節されている (27)。高濃度に保存されている細胞内 K<sup>+</sup>レベルは細胞膜の静止膜電位の形成に重要である。K<sup>+</sup>チャネル開口による細胞外への K<sup>+</sup>流出によって引き起こされる過分極は、この興奮を伴う神経変性を打ち消す。したがって、上記バクロフェンによる PTP 開口抑制及び神経細胞死抑制は、G タンパク質共役型 K<sup>+</sup>チャネルの開口に伴う過分極によると示唆された。しかしながら、同じ実験を GABA<sub>A</sub> 受容体刺激薬ムシモールの前処置により検討したが、Cl<sup>-</sup>チャネル開口に伴う Cl<sup>-</sup>流入では、NMDA によって引き起こされる PTP 開口及び神経細胞死は抑制されなかったことから、単純な過分極によって神経細胞保護を示すのではないことが示された。したがって、細胞膜における K<sup>+</sup>チャネルの開口及び細胞内 K<sup>+</sup>レベルの低下が興奮性毒性より神経細胞を保護することを示唆した (Fig.6)。

### Hypothesis

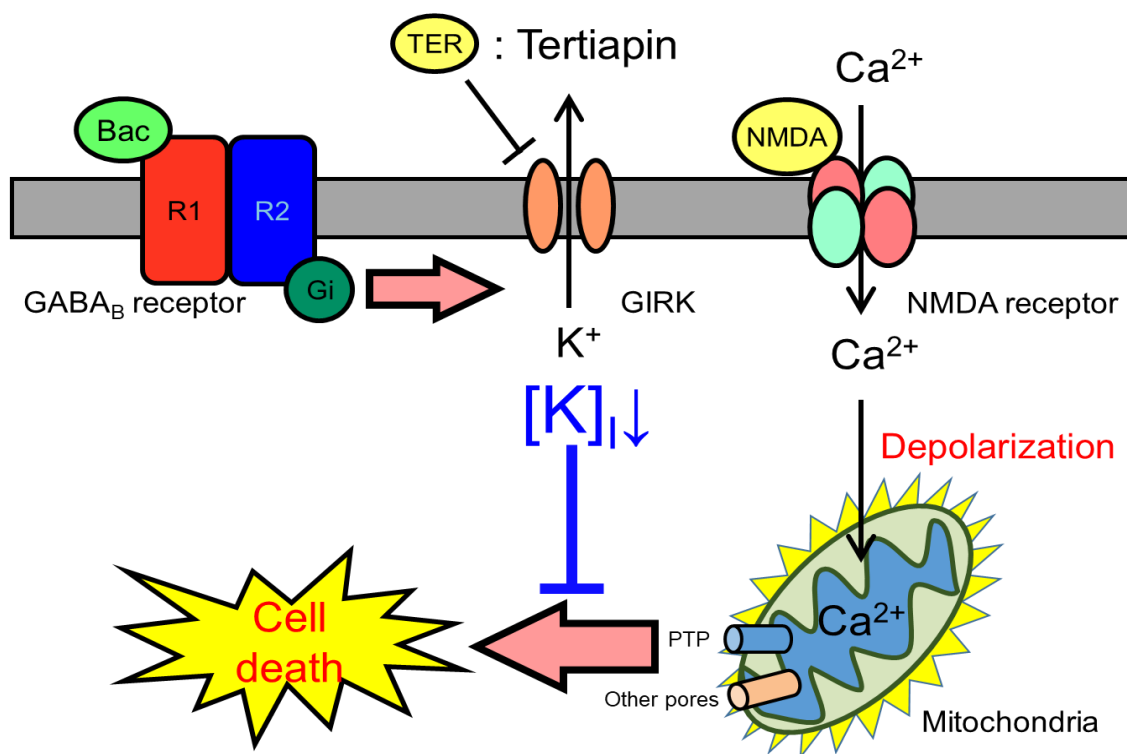
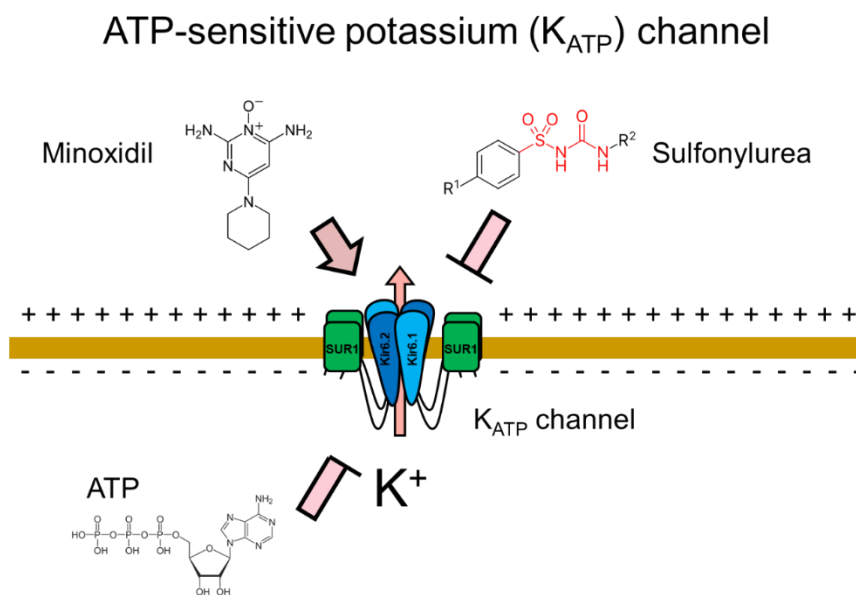


Fig.6. GABA<sub>B</sub> 受容体作動に伴う細胞内 K<sup>+</sup>濃度低下による神経細胞死抑制機構仮説

ATP 感受性  $K^+$  チャンネル ( $K_{ATP}$  チャンネル) は内向き整流性  $K^+$  チャンネルの一種であり、細胞膜に  $K^+$  透過性を与えている (Fig.7)。 $K_{ATP}$  チャンネルの細胞内領域に ATP が結合すると、このチャンネルの  $K^+$  透過性は低下し、細胞膜の脱分極を引き起こす。同様に、糖尿病治療薬であるスルホニルウレア (SU) 剤も、 $K^+$  透過性を低下させることで、細胞膜の脱分極を誘導する。一方、壮年性脱毛症における発毛、育毛及び脱毛の進行予防に効果があるミノキシジルは、 $K_{ATP}$  チャンネル開口薬であり、細胞膜の  $K^+$  透過性を亢進する (28)。 $K_{ATP}$  チャンネルは主に、心臓、腎臓、血管、脳内に発現している。 $K_{ATP}$  チャンネルはヘテロオクタマーとして構成され、例えば、SUR1/Kir6.2 は膵臓、SUR2A/Kir6.2 は心臓で、SUR2B/Kir6.2 は平滑筋で発現していることが報告されている (29)。これらのサブユニットの構成は、異なる機能を示すと考えられてきたが、未だ完全に解明されていない。ミノキシジルは当初  $K_{ATP}$  チャンネルを開口して、心機能を低下させ及び血管平滑筋を弛緩する降圧剤として開発された。その副作用として、発毛作用が見つかった。現在は育毛剤として用いられているが、臨床における降圧剤としての使用は見送られた (30,31)。一方で、ミノキシジルは心臓において、虚血障害を減少させる研究がなされてきた。その機構は、 $K_{ATP}$  チャンネル開口に伴う  $K^+$  排出が誘導する細胞膜の過分極によるものだと考えられている (30,31)。本研究は、ミノキシジルが細胞内  $K^+$  レベルを減少させることがミトコンドリア脱分極の程度を抑制し、さらにその結果、神経細胞において興奮性毒性に対して保護するかを調査した。



神経変性疾患を進行させる因子は部分的に明らかになりつつあるが、きっかけとなる現象が何なのかは未だ明らかではない。そのため、神経変性疾患の進行を遅らせる薬物が存在するが、発症を予防したり根治するための薬物は未だ販売されていない。一方で、脱落した神経細胞を補うため再生医療の研究が盛んになされている。周知の通り生体内における  $K^+$  のホメオスタシスは神経活動だけでなく、生命活動そのものにおいても重要な役割を担っている。本研究では、神経細胞の脆弱性を決める因子として細胞内  $K^+$  レベルに着目し、神経細胞内  $K^+$  バランスを調節するだけで、神経細胞死が抑制されることを明らかにし、神経変性疾患の治療はもちろんのこと、発症そのものを抑制しうる可能性を提唱したい。高齢者人口が増加する中で神経変性疾患患者は増加する一方であり、患者自身だけでなく、看護者および介護者にも負担がかかり、経済的損失も大きい。本研究では、新しい神経変性疾患予防と治療に繋がる標的として細胞内  $K^+$  レベル低下を提案することを目的とし、高齢化社会がもたらす問題を減らすための一助となることを目指した。

## 略語

本稿に使用した略語は以下の通りである。

5-HD, 5-hydroxy decanoic acid	GABA, gamma amino butyric acid
$\beta$ - GP, $\beta$ -Glycerophosphate	HRP, Horseradish peroxidase
AIF, Apoptosis induced factor	ICA, Internal carotid artery
APG-2, Asante potassium green-2 (AM)	[K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> , intracellular K <sup>+</sup> concentration
ATP, Adenosine triphosphate	K <sub>ATP</sub> channel, Adenosine triphosphate sensitive potassium channel
AUC, Area under curve	MCA, Middle cerebral artery
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , intracellular Ca <sup>2+</sup> concentration	MCAO, Middle cerebral artery occlusion
CCA, Common carotid artery	MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
CCCP, Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone	NMDA, N-methyl-D-aspartic acid
DiSC3(5), 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide	SDS, Sodium lauryl sulfate
DIV, Days in vitro	TBST, 0.05% Tween-20 containing Tris-buffer saline
DNP, Dinitrophenol	TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor alpha
ECA, External carotid artery	TTC, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
EDTA, Ethylene diamine tetraacetic acid	UV, ultraviolet
EGTA, Ethylene glycol tetraacetic acid	PFA, Paraformaldehyde
FCCP, Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone	PPA, Polyphosphates
FluxOR, FluxOR potassium Ion Assay Kit	PTP, Permeability transition pore
GIRK, G protein-activated inwardly rectifying potassium channel	ROS, Reactive oxygen species

# 第1章 中大脳動脈結紮術による神経組織障害とミノキシジル投与に伴う抑制効果の検討

## 1.1. 序文

近年、血栓溶解療法やカテーテルによる血栓除去術の普及により、脳梗塞発症直後における死亡率は、全脳血管疾患のうちで最も低くなった。エダラボンはフリーラジカルスカベンジャーとして虚血障害に対して劇的な治療効果を示し(10)、脳梗塞急性期に伴う神経症候、日常生活動作障害及び機能障害の改善に適応がある。しかしながら、後遺症に対する医療費や介護費用は莫大であるだけでなく、年月を経ることで死亡率が上昇する傾向にある。身体的後遺症がある方の死亡原因の多くは、嚥下障害による誤嚥性肺炎である(32)。したがって、遅発性にあらわれる神経系の障害を予防する方法や治療法の開発・確立が急務である。

中大脳動脈結紮術(MCAO)は、一過性脳虚血再灌流モデル動物を作成する世界で最も用いられている手法の一つである。再灌流に伴う脳傷害はグルタミン酸を介した興奮性神経毒性を来すため、MCAOは興奮性毒性のモデルとしても有用である(8)。MCAO後の動物には運動機能障害が起こり、様々な行動薬理学的手法を用いることで評価される。脳血管疾患の後遺症には、身体的運動機能障害、学習記憶障害や失語症などの高次脳機能障害、及び摂食・嚥下障害などの末梢神経系による器官支配の異常などがある。MCAO後の動物でも認知機能障害が現れる。特に空間学習に対する障害は長期にわたって認められる(33-35)。また、MCAO後の動物では、運動機能障害も低下し、テイルサスペンションテストやロータロッドテストがその運動機能の評価する試験として用いられてきた。遠心性伝導路は必ず中枢神経系のどこかで反対側に交叉するため、梗塞した側と反対側の麻痺が生じる。中枢神経系で神経細胞の脱落が生じると、その残骸はグリア細胞によって除去される。このため、その領域におけるグリア細胞の増加が確認できる(グリオシス)。ただし、グリオシスは脱落した神経細胞が元々占有していた体積のすべてを埋め尽くさないため、脳の萎縮や脳室の拡大が認められる。脳の萎縮や脳室の拡大は概ね運動機能障害と相関する。したがって、脳梗塞発症後の脳の萎縮および脳室の拡大が麻痺の指標となる。先述したとおり脳神経は交叉するため、梗塞に対して反対側の麻痺が生じ、梗塞側側の半身を用いた運動比率が上昇する。

本章では、本研究の第一歩としてMCAO処置後のマウスにおける、脳組織レベルの障害の指標として脳実質の細胞内呼吸及び代謝活性の異常を検出し、半身麻痺の指標として自

発運動量と一方向性旋回運動比率測定し、予後の指標として 28 日間生存曲線の作成及び脳実質の萎縮の程度を定量することにした。

## 1.2. 方法

### 1.2.1. 試薬

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)、Cresyl violet は Sigma Aldrich 社、ミノキシジルは富士フィルム和光純薬社、エダラボンは Tocris bioscience 社の製品の標準グレードのものをを用いた。ImageJ は Wayne Rasband at National Institutes of Health 社の製品である。

### 1.2.2. 動物

摂南大学動物実験倫理委員会によって承認され、日本薬理学会ガイドラインに沿ったプロトコルを用いた。中大脳動脈結紮術 (MCAO) 実験には C57BL6 雄性マウス体重 18-20g を使用した。初代培養は Std-ddy 妊娠マウスを使用した。飼育環境は、12 時間おきに点消灯下、23 °C 湿度 55%及び水、餌は自由に摂取させる環境で飼育した。

### 1.2.3. 中大脳動脈結紮術 (MCAO)

一過性虚血は以前に報告されたものをわずかに修正して行われた (8)。マウスはメデトミジン (0.75 mg/kg b.w.)、ミダゾラム (4 mg/kg b.w.) 及びブトルファノール (5 mg/kg b.w.) 混合注射液を腹腔内投与することで深く麻酔下においた。70%エタノールによって頸部を消毒した後、正中線で切開し、左総頸動脈を露出した。縫合糸を用いて、遠位外頸動脈を結紮し、この結紮点から近位で分岐した血管を結紮した。次に総頸動脈を一時的に結紮して心臓からの血流を止め、総頸動脈分岐点より遠位にある内頸動脈をクリップにより一時的に血流を遮断して、血液の逆流を防いだ。遠位外頸動脈結紮点より少し近位に「穴」をあけ、0.05-0.069 mm の太さの糸の先端に長さ 400  $\mu$ m、太さ 180-200  $\mu$ m のシリコンを付着したシリコンファイバーを挿入した。このシリコンファイバーは、外頸動脈より、総頸動脈へ誘導された後、近位外頸動脈を緩く結紮した。内頸動脈上に留置されたクリップを取り除き、内頸動脈へシリコンファイバーを誘導した。シリコンファイバーはさらに挿入し、遠位頸動脈上の「穴」より 9-10 mm 挿入することで、ウィリス脳動脈輪にある、中大脳動脈に到達させ、シリコンファイバーの先端のシリコンがこれを閉塞した。ここで近位外頸動脈を十分強く結紮し、1 または 2 時間閉塞状態を継続した。血液の再灌流は、血管を閉塞しているシリコンファイバーがついた糸を引き、シリコンファイバーが中大脳動脈から近位外頸動脈結紮部

位まで後退させることで行った。したがって、シリコンファイバーは留置された。術終了後、縫合糸で頸部切開部を閉じた。

#### 1.2.4. TTC 染色

再灌流から 24 時間後に脳梗塞領域を評価するため、マウスを断頭した。脳をすばやく摘出し、氷上の生理食塩水に静置した。ブレインスライサーを用いて、ブregマより、前方に 2 枚、後方に 3 枚の合計 5 枚の厚さ 1000  $\mu\text{m}$  冠状切片を作成した。作成した脳切片を 0.8% 2,3,5 トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) 生理食塩水溶液で 37°C、10 min 間浸潤することで、染色し、写真を撮影後 Image J を用いて、脳損傷領域を測定した。

#### 1.2.5. 自発運動量測定・生存曲線

マウスの自発運動量は Open field 試験法により測定した。マウスを 40 cm×20 cm×30 cm の長方体空間において自由に歩かせ、これを上側からカメラで動画撮影し、Anymaze を用いて定量化した。定量化は 60 分間の総移動距離、静止時間、平均移動速度、最高移動速度、一方向性回転運動の解析を実施した。MCAO 手術を施したマウスは再灌流後 24 時間後の自発運動量の観察を行った。生存曲線の作成は各群 6-8 匹程度のマウスを用意することで評価した。

#### 1.2.6. ニッスル染色

再灌流から 28 日後のマウスに抱水クロラール (500 mg/kg b.w.) を腹腔内投与することで麻酔下においた。開胸して、右心耳を切開し、左心室に注射針を挿入した。ここからペリスタポンプ (流速 8 mL/min) で生理食塩水を灌流させ、脱血後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 4% paraformaldehyde (PFA) を体重 10 g あたり 15 mL の割合で灌流した。摘出した脳は PFA に浸し、4°C オーバーナイトで後固定を行った。その後標本を細切し、流水洗浄を 1 時間行った。次いで、エタノール脱水系列 (70~100%) を通し、キシレンで透徹後にパラフィンを浸透させた。パラフィン包埋ブロックを厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を調製し、伸展後に親水性シランコーティングスライドガラスに貼り付けられ、40°C オーバーナイトで乾燥させた。パラフィン切片はキシレンにて脱パラフィン処理を行った後、エタノール親水系列 (脱水系列の反対) を通し、段階的に親水処理を行った。その後、0.1% クレシルバイオレットを滴下して 5 分間染色を行った。染色後、酢酸含有エタノールにて脱色した後、顕微鏡下で観察した。脳組織障害領域は image J にて定量化した。

#### 1.2.7. データ解析

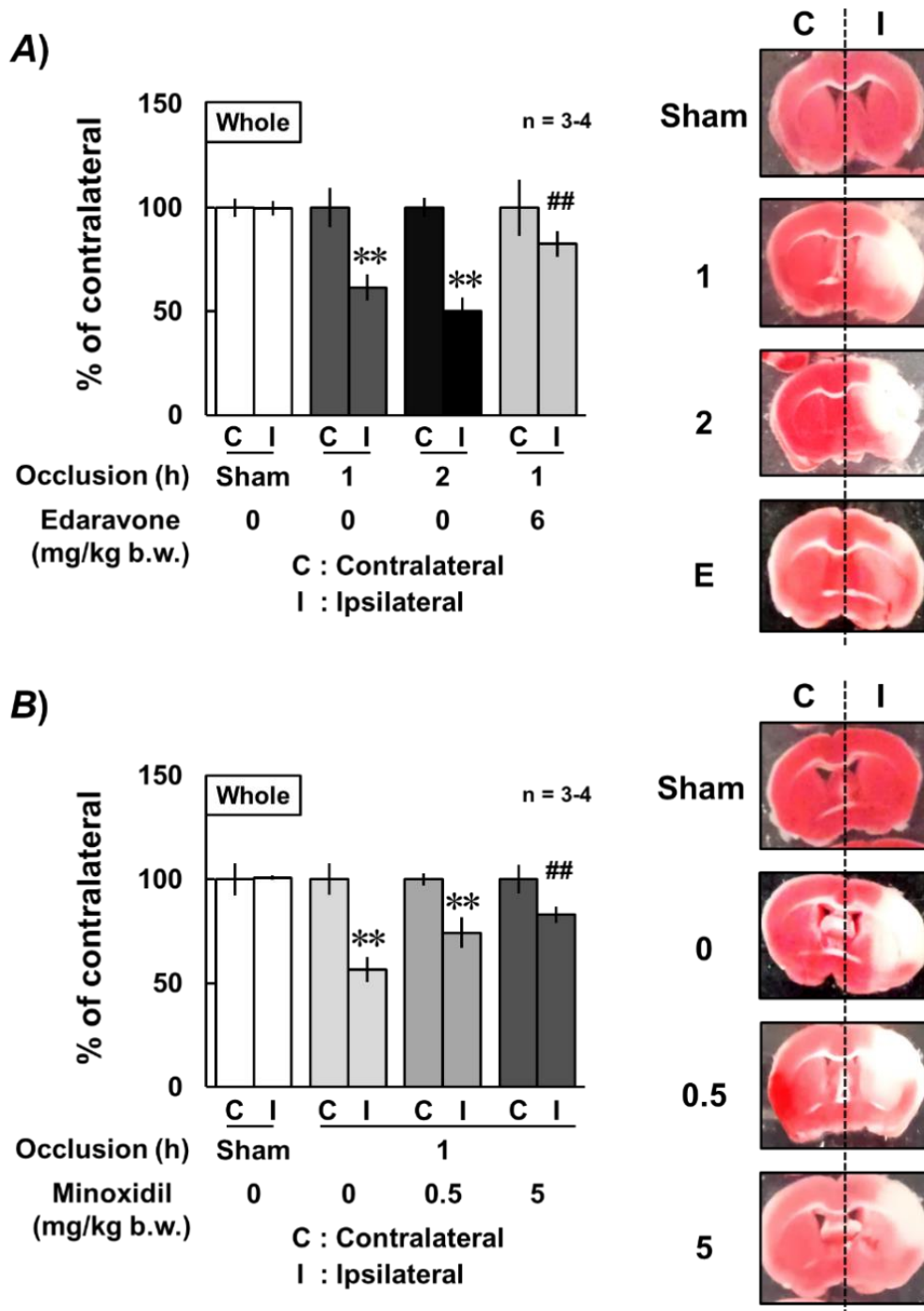


TTC 染色及び蛍光強度の変化は ImageJ にて定量した。TTC 染色の関心領域 (ROI) は左右大脳半球をそれぞれ覆うように定義された。その上で画像中各ドットのシグナル強度を数値化した。すべてのデータは平均値±標準誤差で示し、Student's t-test または Bonferroni's test により有意差検定を実施した。生存曲線は Log rank test を実施した。

## 1.3. 結果

### 1.3.1. ミノキシジルによる虚血障害後の細胞内呼吸活性低下に対する抑制作用

マウスに対し最大 2 時間の MCAO を実施し、その後血液を再灌流した。再灌流後 24 時間後、脳を取りだし、ブレグマ付近の冠状切片を調製し、2,3,5 トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) で染色した (Fig.8)。TTC 染色は生細胞を細胞内呼吸によって 1,3,5 トリフェニルホルマザンである赤色代謝物に変換することにより、生細胞を標識する染色法である。白色の領域は細胞が欠損しているもしくは細胞の呼吸活性が低下していることを示している。MCAO は片側のみ行った。MCAO 側 (Ipsilateral side: I) の大脳皮質大部分と線条体領域は、赤色に染色されず、白いままであった。反対側 (Contralateral side: C) はすべて赤色に染色されており、定量的に比較すると、I は C よりその染色領域が有意に減少していた。したがって、脳虚血により障害が引き起こされた領域の細胞において、細胞内呼吸が障害されていることが示唆された。白い領域は MCAO の期間 1 時間と 2 時間の間で変化しなかったが、エダラボンを MCAO 直後に尾静脈より急速静注した結果、染色領域が有意に上昇した (Fig.8A)。したがって、エダラボンは MCAO による障害から保護作用を示すことが確認された。同様に、MCAO により有意に減少した赤色染色領域は、5 mg/kg b.w. ミノキシジル投与により有意に回復した (Fig.8B)。したがって、エダラボン同様に、ミノキシジルもまた脳虚血障害を減少させる薬物である可能性が示された。



**Fig.8.** 中大脳動脈結紮術後中枢神経系細胞の細胞内呼吸低下に対するエダラボン及びミノキシジルの影響  
 中大脳動脈結紮術は C57/BL6 雄性マウス 6 週齢の片側 (ipsilateral : I) に対して 1 時間もしくは 2 時間処置された。エダラボン (A) もしくはミノキシジル (B) は、MCAO 処置直後に投与した。脳は MCAO 処置 24 時間後に摘出され、ブレインスライサーを用いてブレグマから前方に 2 枚、後方に 3 枚の厚さ 1000  $\mu\text{m}$  の冠状切片を 5 枚作成した。冠状切片は細胞内呼吸インジケーターである 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライドによって染色した。右側に示す染色像は代表的なものを示す。両側の染色程度を定量し、平均値を算出した。左側に示すグラフは反対側 (colateral : C) と同側 (ipsilateral : I) を比較した結果を示し、処置を下記に示した。\*\* $p < 0.01$  vs. ipsilateral of sham, # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  vs. ipsilateral without minoxidil (0 mg/kg b.w.) (Bonferroni's test). (Fig.8. は文献 74 より引用した)

### 1.3.2. 中大脳動脈結紮術 24 時間後における自発運動量変化

MCAO による脳虚血負荷 1 時間後、血流を再灌流した 24 時間後のマウスについて Open field を用いて静止時間、総移動距離、旋回回数、全旋回を測定し、右方向への一方向性旋回運動の比率（右旋回比率）を算出した（Fig.9）。その結果、静止時間、総移動距離、旋回回数に変化は認められなかった。一方、右旋回比率は MCAO 群で有意に増加し、測定した動物の約 80%が右旋回運動を行った。これに対して、ミノキシジル投与群では、右旋回運動比率は約 50%程度まで有意に減少させ、Sham 群と同程度であった。

## Locomotion

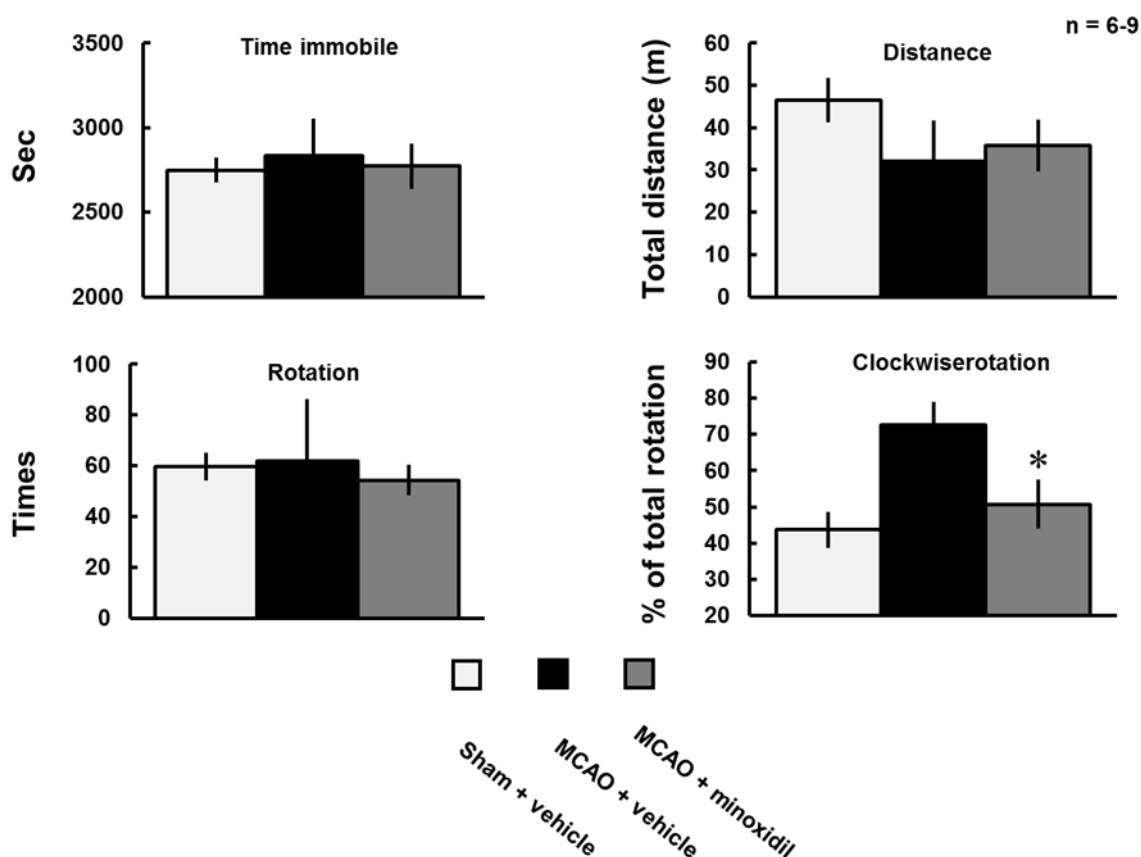


Fig.9. MCAO 負荷 24 時間後における自発運動量変化

40 cm x 20 cm 四方内にマウスを入れて 60 分間自発運動させ、これを上から動画撮影した。動画から静止時間、総移動距離、旋回運動、旋回回数に対する右方向への一方向性旋回運動の比率（右旋回比率）を算出した。静止時間、総移動距離に変化は認めないものの、右旋回比率が MCAO 負荷によって、おおよそ 80%程度まで上昇した。一方で、ミノキシジルはこの一方向性の旋回運動比率の上昇を有意に改善した。\* $p < 0.05$  vs. MCAO vehicle experiment (Student's t-test).

### 1.3.3. 中大脳動脈結紮術 28 日後の生存曲線

MCAO による脳虚血負荷 28 日（4 週）までの生存曲線を作成した（Fig.10）。その結果、Vehicle 群では脳虚血負荷 7 日間に絶命する動物が認められたが、以降 28 日後まで絶命する動物は認められなかった。ミノキシジル投与群では 5 日目まで動物の個体死が認められたが以降 28 日目まで認められなかった。しかしながら、Vehicle 群及びミノキシジル投与群間に有意差は認められなかった。

### 1.3.4. 中大脳動脈結紮術 28 日後のニッスル染色像

MCAO による脳虚血負荷 28 日（4 週）後における脳の萎縮、脳室の拡大をニッスル染色を用いて確認した（Fig.11）。その結果、Sham 群においては、脳実質の萎縮および脳室への影響は認めなかった。一方で脳虚血負荷によって脳実質の萎縮、脳室の拡大を認めた。したがって、脳虚血負荷 28 日間少なくとも個体死には至らないものの、神経組織が傷害を受けていることが確認できた。

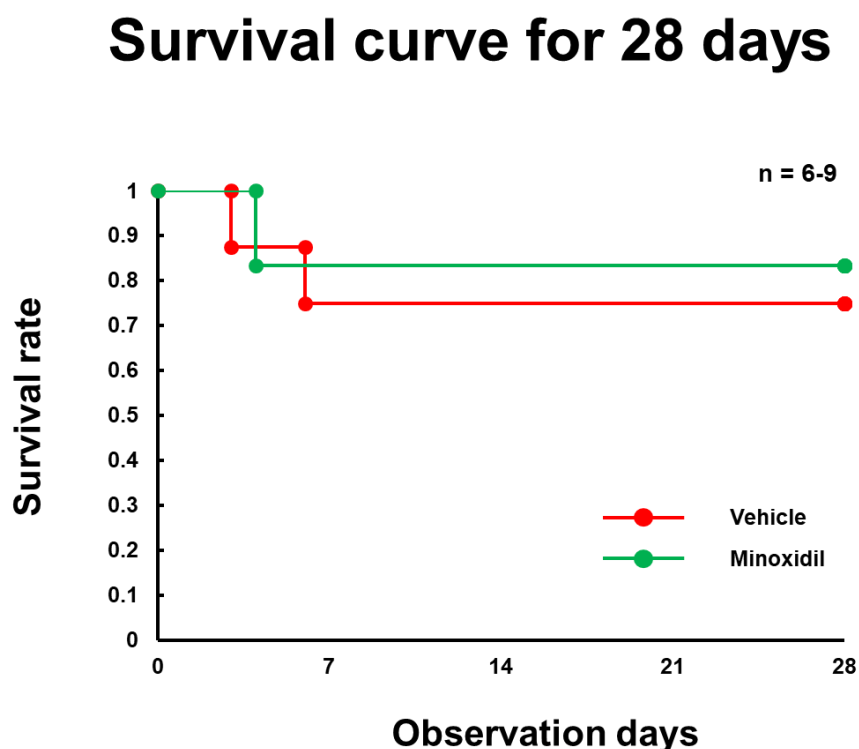
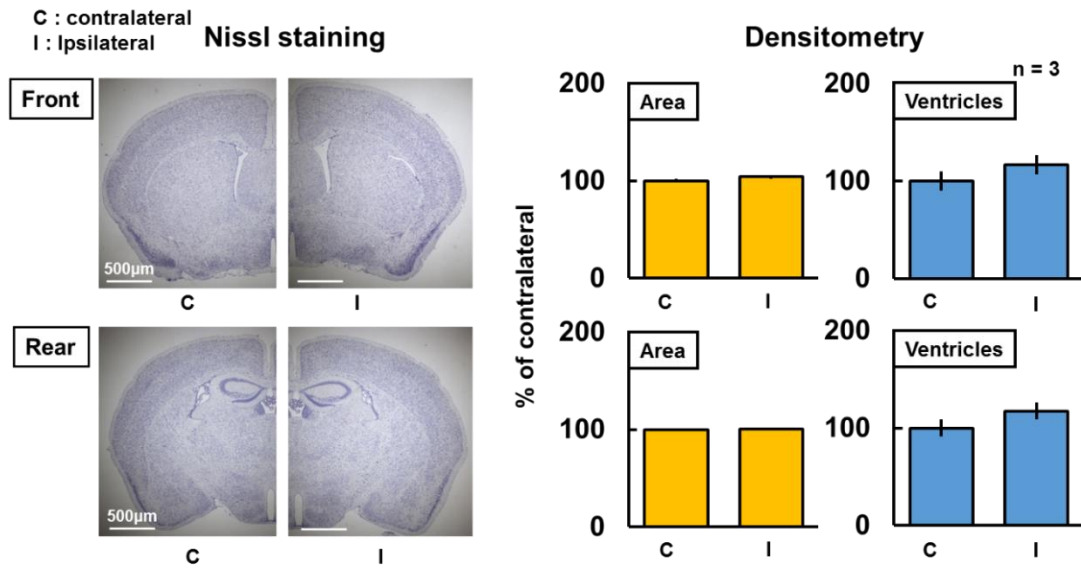


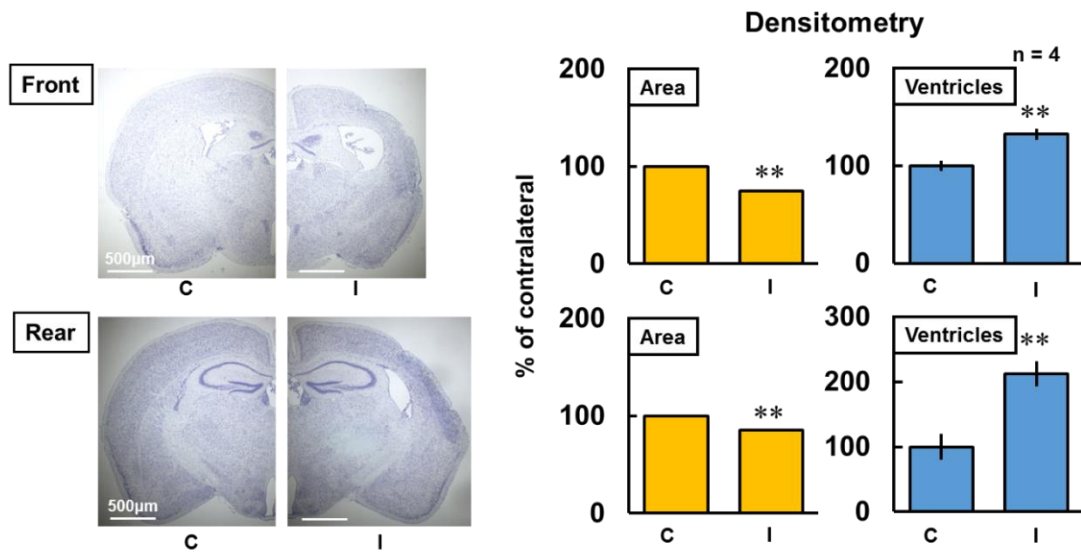
Fig.10. MCAO 負荷 28 日間における生存率変動

MCAO 後 28 日間毎正午に生死を確認することで生存曲線を作成した。vs. vehicle experiment (Log rank test).

## Sham ope



## MCAO-Vehicle



**Fig.11. MCAO による脳虚血負荷 28 日後におけるニッスル染色像**

MCAO 負荷 28 日後に麻酔下においてマウスを開胸した後、右心耳を切開し、左心室に注射針を挿入し、生理食塩水にて脱血し、4% paraformaldehyde (PFA) にて灌流固定した後、24 時間浸潤固定を行った。浸潤固定後、脳をパラフィン包埋し、厚さ 5 µm の切片を作成し、ニッスル染色にて脳萎縮、脳室の拡大を観察した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. each group of contralateral (Student's t-test).

## 1.4. 考察

本章の結果より、本研究でも MCAO による脳虚血 1 時間負荷後から再灌流した 24 時間後マウスの脳実質の細胞内呼吸及び代謝活性の異常が認められ、右旋回比率が高いことから運動機能障害が認められることが確認された。脳組織レベル障害はエダラボンによって完全に抑制されたが、一方で、ミノキシジルは虚血性障害を完全には抑制せず、周辺部位のみ抑制した。本研究に用いたミノキシジル濃度は十分な濃度である (36)。さらに高濃度のミノキシジルが責任領域を減少できるかどうかは重要な課題であるが、疑問である。血流低下による障害は、低酸素に伴う活性酸素の増加が主となり、神経系細胞や血管内皮細胞などその領域を構成するすべての細胞を傷害する (Fig.1) (37)。再灌流後は、死んだ神経細胞から遊離したグルタミン酸や傷んだ内皮細胞により流出した血漿由来成分により刺激を受けた周辺領域の神経細胞が傷害を受け始める (38)。ミノキシジルは周辺領域の神経組織障害を予防しているのではないだろうか。In vivo 実験系において、ミノキシジルが血液脳関門を通過し、神経細胞に対して直接作用したのかは調査していない。一方で、ミノキシジルの作用点である  $K_{ATP}$  チャネルは神経細胞だけでなく、血管内皮細胞及びグリア細胞にも発現、機能しているからである。したがって、ミノキシジルのこれら血管内皮細胞やグリア細胞に対する影響はさらに調査する必要がある (39)。ミノキシジルの詳細な分子機構は不明ではあるが、いずれにしても細胞内  $K^+$  レベルを低下させる  $K_{ATP}$  チャネル開口薬であるミノキシジルが MCAO に伴う周辺領域の障害を改善したことが証明された。

また、本章の結果より、MCAO による脳虚血 1 時間後から再灌流した 28 日後のマウスの脳実質では神経細胞の有意な減少が認められるとともに、脳室の有意な拡大が認められた。しかしながら、生存曲線の解析結果から、再灌流 1 週間以内に死ぬ動物はいるが、その後は少なくとも 28 日目まで生存した。ヒトの場合、一般的に脳梗塞における致死率は全脳卒中中において最も低い。脳梗塞発症患者における死亡は発症直後よりも発症後、麻痺に基づく誤嚥性肺炎により数年後死亡することが多い。ヒトに対する追跡調査においてはおおよそ 5 年以内の死亡率が高く、致死率と脳梗塞後における脳実質の萎縮及び脳室の拡大は正に相関する (32)。したがって、本研究における「1 時間脳虚血」という MCAO 条件がマイルドであった可能性がある。この生存曲線はミノキシジルでは変化しなかった。上述のように、再灌流 24 時間後のマウスの脳実質の細胞内呼吸及び代謝活性の異常や、一方向性回転運動はミノキシジルで抑制された。一方で、ミノキシジル投与に伴うニッスル染色像の変化は確認しておらず、今後検討が必要である。また脳実質の傷害は認知機能を変化させる可能性があり、今後測定する必要があると思われる。

## 第2章 初代培養神経細胞における興奮性毒性に対するミノキシジルの抑制効果

### 2.1. 序文

前章の結果から、ミノキシジルはMCAO負荷による生存率にこそ影響を及ぼさないものの、梗塞巣の有意な減少および行動学的半身麻痺の改善を認め、神経細胞保護作用を示した。一方で、ミノキシジルの作用点である $K_{ATP}$ チャネルは中枢神経系のみならず、多臓器に発現していることが知られている。一般的に $K_{ATP}$ チャネルは糖尿病治療薬であるスルホニルウレア (SU) の標的タンパク質であり、インスリンの分泌に関与していることは、広く知られた事実である。糖尿病は血管脆弱性を亢進させるため、脳血管疾患に対する独立した危険因子である。そのため、その治療薬が必ずしも脳血管疾患の発症リスクを上昇させるわけではない。しかしながら、その他糖尿病治療薬と比較して、SU剤は脳血管疾患に対するリスクが高いことが報告されている(40,41)。これは、長期的に細胞内 $K^+$ レベルを上昇させることで、発症リスクが上昇しているのではないだろうか。本章においては、ミノキシジルによる神経細胞保護作用の詳細なメカニズム解析のためマウス初代大脳皮質神経細胞株を調製し、これを用いて解析を試みた。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 試薬

Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus は Perkin Elmer 社より、X線フィルムは富士フィルム社、PVDF膜は Millipore 社、-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)、Sepasol®-RNAiSuper G、バリノマイシン、GABA、NMDA はナカライテスク社、MitoTracker® Green FM and FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay は Thermo Fisher Scientific 社、Asante potassium green-2 (AM) は Texas Fluorescence Labs 社、NeuroBrew-21 は Miltenyi Biotec 社、ミノキシジルは富士フィルム和光純薬社の製品の標準グレードのものを用いた。抗 AIF 抗体 (sc-13116)、抗チトクロム c 抗体 (sc-13156) は Santa cruz biotechnology 社、抗 Lamin A/C 抗体 (#4777)、抗 Caspase-3 抗体 (#9665)、抗 Cleaved caspase-3 抗体 (#9664) は Cell signaling technology 社、抗 $\beta$ -tubulin 抗体 (014-25041)、抗 GAPDH 抗体 (014-25524) は富士フィルム和光純薬社の製品である。ImageJ は Wayne Rasband at National Institutes of Health 社、FluoView™ FV1000 confocal microscope Olympus 社、ImageQuant™ 400 は GE 社の

製品である。

## 2.2.2. 動物

1.2.2.に準じて飼育した。初代培養は Std-ddy 妊娠マウスを使用した。

## 2.2.3. 初代大脳皮質神経細胞培養

E14.5 胎児マウスを摘出し、顕微鏡下で大脳皮質を分離した。大脳皮質は、0.02% EDTA 溶液で 10 分間室温にてインキュベートし、その後 33 mM グルコース入り PBS で洗浄した。組織はその後、先端を熱して細く調整したパスツールピペットにて 2 mM Glutamax 入り Neurobasal medium (以下 Neurobasal) 内で分散された。その細胞懸濁液は遠心され、フレッシュな Neurobasal で再懸濁された。細胞は特別な場合を除き蛍光イメージング目的に 100,000 cells/200 mm<sup>2</sup>、他実験目的に、300,000 cells/200 mm<sup>2</sup>で播種した。培養液は 3 日に 1 回全量をフレッシュな Neurobasal に変更した。mRNA 回収、蛍光イメージング及び NMDA 曝露実験は 8 DIV に行った。細胞破砕液を調製する際は培養細胞をシリコンスクレーパーを用いて回収した。

## 2.2.4. 逆転写 PCR (RT-PCR)

マウス大脳皮質組織及び大脳皮質神経細胞を Sepasol®-RNAISuper G を用いて可溶化し、トータル RNA を抽出した。トータル RNA 1 µg の試料を逆転写し、cDNA は直ちに使用するまで -30 °C で保存した。本研究では *KCNJ8* (*Kir 6.1*)、*KCNJ11* (*Kir6.2*)、*ABCC8* (*SUR1*) 及び *ABCC9* (*SUR2*) の遺伝子発現の検出を行った。対応するプライマー配列は、*Kir6.1F*: 5'-CACAAGAACATCCGAGAGCA-3'、*Kir6.1R*: 5'-TTCTCCATGGTGCCTTTCTC-3'、*Kir6.2F*: 5'-CTGGCCATCCTCATTCTCAT-3'、*Kir6.2R*: 5'-CTCTTTCGGAGGTCCCCTAC-3'、*SUR1F*: 5'-CCCTCTACCAGCACACCAAT-3'、*SUR1R*: 5'-CAGTCTGCATGAGGCAGGTA-3'、*SUR2F*: 5'-CCGAGAGGTTGAAGAAGACG-3'、*SUR2R*: 5'-TGCGTTCATGAAGATGGAAA-3'を用いて、PCR 産物は電気泳動し 0.8% TAE アガロースゲルにて検出し、ImageQuant™ 400 を用いて撮影を行った。

## 2.2.5. 蛍光指示薬によるミトコンドリア検出と膜電位変動解析

記録溶媒としてカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) とマグネシウムイオン (Mg<sup>2+</sup>) を含まない、137 mM 塩化ナトリウム、4.17 mM 炭酸水素ナトリウム、0.34 mM リン酸水素二ナトリウム、5.37 mM 塩化カリウム、0.44 mM リン酸二水素カリウム、5.55 mM グルコースを含む Hank's 平



平衡緩衝液に最終濃度 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) と最終濃度 2.0 mM 塩化カルシウムを添加した混合溶液 (以下 HHBSS) を用いた。ミトコンドリア検出のために、MitoTracker® Green FM と 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide [DiSC<sub>3</sub>(5)]を加えた HHBSS で 30 分間インキュベートを行った。ミトコンドリア脱分極の検出は、最終濃度 250 nM DiSC<sub>3</sub>(5)を加えた HHBSS にて、37 °C in 95% air/5% CO<sub>2</sub> 条件下で 30 分間ローディングを行った。ミノキシジルの前処置は、ローディングの最終 5 分間に処置された。写真や連続撮影は、FluoView™ FV1000 共焦点顕微鏡で行った。連続撮影は、5 秒間隔に 38 枚、つまり 180 秒間撮影を行った。撮影開始 30 秒間はバックグラウンドとして撮影し、その直後バリノマイシンや NMDA 等の薬物曝露を実施し、さらに撮影を継続した。撮影画像中の蛍光強度は、Image J にて定量化した。励起波長/発光波長はそれぞれ、MitoTracker® Green FM では 488 nm/520-560 nm、DiSC<sub>3</sub>(5)では 635 nm/650-750 nm であった。

### 2.2.6. K<sup>+</sup>チャネル開口と細胞内 K<sup>+</sup>レベル検出

カリウムイオン (K<sup>+</sup>) チャネル開口を確認するために、FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay を用いた。タリウムイオン (Tl<sup>+</sup>) 指示薬を含むローディングバッファーに置換し、60 分間インキュベートを行い、その後アッセイバッファーに置換し、刺激実験を行うまで、さらに 30 分間インキュベートした。写真及び連続撮影は FluoView™ FV1000 共焦点顕微鏡で行った。連続撮影は撮影間隔 5 秒間で 50 枚つまり 250 秒間撮影を行った。撮影開始 30 秒間はバックグラウンドとして、その後 Tl<sup>+</sup>やミノキシジルを含む刺激バッファーを添加した。K<sup>+</sup>チャネルが開口し、Tl<sup>+</sup>が細胞内に流入すると Tl<sup>+</sup>蛍光指示薬は緑色蛍光を呈する。細胞内 K<sup>+</sup>レベルを検出するために、ミノキシジルを含むもしくは含まない HHBSS を 5 分間置換し、その後 Asante potassium green-2 (AM) [APG-2]を最終濃度 2 μM になるように添加し、30 分間インキュベートを行った。APG-2 と Tl<sup>+</sup>蛍光指示薬の励起波長は共に 488 nm であり、発光波長は 520-560 nm で検出を行った。

### 2.2.7. MTT 還元能の測定 (MTT Assay)

薬物は HHBSS に溶解することで調製した。細胞は 2 分間の NMDA 処置のために HHBSS に置き換え、30 分間インキュベートを行った。ミノキシジルの前処置は NMDA 曝露 5 分前に行った。2 分間の NMDA 曝露後に新たな Neurobasal に置換し、24 時間培養した。3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)アッセイは、0.5 mg/ml MTT、33 mM グルコースを含む PBS に交換し、さらに 37 °C、95% air/5% CO<sub>2</sub> で 2 時間インキュベートした。生細胞によって誘導されたホルマザンは 0.04 mol/L HCl を含む 2-プロパノールに可溶化し、570 nm の吸光度を測定した。

### 2.2.8. イムノブロット法

マウス大脳皮質組織及び NMDA 曝露 6 時間後における大脳皮質神経細胞を氷冷条件下ホモジナイジングバッファー (10 mM Tris-HCl, 0.32 M Scrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM PPA, 10  $\mu$ M  $\beta$ -GP, 50 mM NaF) に回収し、テフロンホモジナイザー (300 rpm, 1 min) を用いて破碎し総細胞懸濁液を調製した。総細胞質画分を調製する場合、細胞懸濁液を 100,000 g、60 min、4°C で遠心し、上澄みを細胞質画分として用いた。核画分を調製する場合、細胞懸濁液を 1,000 g、10 min、4°C で遠心した後、上澄みを除去し、10%トリトン溶液を最終濃度 0.05%となるよう添加し、攪拌後氷上で 5 分間静置した。さらにこれを 20,000 g、5 min、4°C で遠心を行い、上澄みを除去し、沈殿を超音波破碎し、これを核画分とした。総細胞質画分、細胞質画分または核画分中のタンパク質試料は 2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール、0.01% ブロモフェノールブルーを含む緩衝液で 100 °C、10 分間煮沸した後、使用するまで、即時に -80 °C で冷凍保存した (42)。総量 5  $\mu$ g のタンパク質を 12.5%ポリアクリルアミド電気泳動し、PVDF 膜に転写した。メンブレンは、5%スキムミルクを可溶化させた、0.05% Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBST) で 1 時間ブロッキングした。一次抗体は 2 時間、西洋ワサビペルオキシターダーゼ (HRP) 共役二次抗体は 1 時間室温にてインキュベートした。HRP は Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus と反応し、反応光は X 線フィルムを用いて検出、もしくは ImageQuant™ 400 にて撮影を行った。抗 AIF 抗体、抗チトクロム c 抗体、抗 Lamin A/C 抗体はそれぞれ 1000 倍希釈、抗 Caspase-3 抗体、抗 Cleaved caspase-3 抗体はそれぞれ 5000 倍希釈、抗 GAPDH 抗体は 10000 倍希釈で用いた。

### 2.2.9. 免疫化学染色法

大脳皮質神経細胞をミトコンドリア標識蛍光物質であるマイトトラッカーを添加 30 分後に 4%パラホルムアルデヒド (PFA) により固定した。Blocking one Histo を用いて 1 時間ブロッキングを行い、Dako を用いた希釈一次抗体溶液を 2 時間、0.03 % TBST を用いた希釈二次抗体溶液を 1 時間の反応を行い、Hoechst33342 を用いて核の標識を行った後、共焦点顕微鏡下で観察した。抗 AIF 抗体は 100 倍希釈にて用いた。

### 2.2.10. データ解析

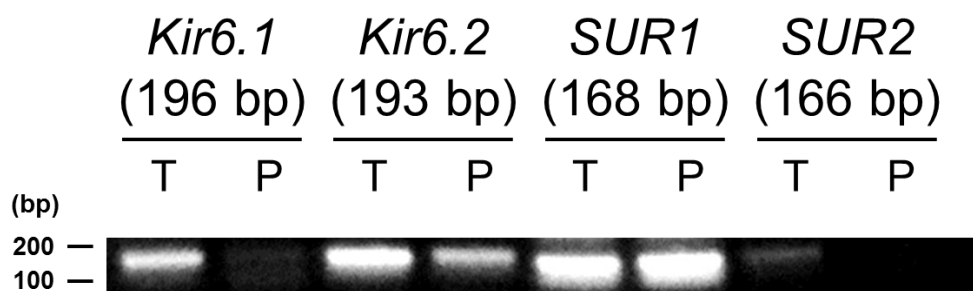
TTC 染色及び蛍光強度の変化は ImageJ にて定量した。TTC 染色の関心領域 (ROI) は左右大脳半球をそれぞれ覆うように定義された。蛍光強度の変化の定量では、ノイズ以外すべての領域を ROI と定義した。その上で画像中各ドットのシグナル強度を数値化した。RT-PCR のデンシトメトリー分析と、免疫ブロッティングは ImageQuant™ 400 を用いて解析した。すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、Student's t-test または Bonferroni's test によ

り有意差検定を実施した。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 大脳皮質神経細胞における $K_{ATP}$ チャンネル構成サブユニット遺伝子発現

$K_{ATP}$  チャンネルはミノキシジルによって開口する内向き整流性  $K^+$ チャンネルである (28)。また、 $K_{ATP}$  チャンネルはスルホニルウレア受容体と  $Kir6.X$  による複合体を構成するヘテロオクタマーとして存在する。 $K_{ATP}$  チャンネルを構成する遺伝子には  $KCNJ8$  ( $Kir6.1$ )、 $KCNJ11$  ( $Kir6.2$ )、 $ABCC8$  ( $SUR1$ )、 $ABCC9$  ( $SUR2$ ) (43) がある。したがって次に、本研究で用いた初代大脳皮質培養神経細胞におけるこれら遺伝子発現を検討した (Fig.12)。その結果、成体マウス大脳皮質には  $Kir6.1$ 、 $Kir6.2$ 、 $SUR1$  及び  $SUR2$  の遺伝子が発現していたが、マウス胎児から調製した初代培養神経細胞では、 $Kir6.2$  及び  $SUR1$  のみが発現していた。したがって、これら遺伝子のタンパク質発現を確認していないが、初代培養神経細胞には、少なくとも  $Kir6.2$  及び  $SUR1$  によって構成されるチャンネルが発現しうることが示唆された。



T : Tissue (cerebral cortex)

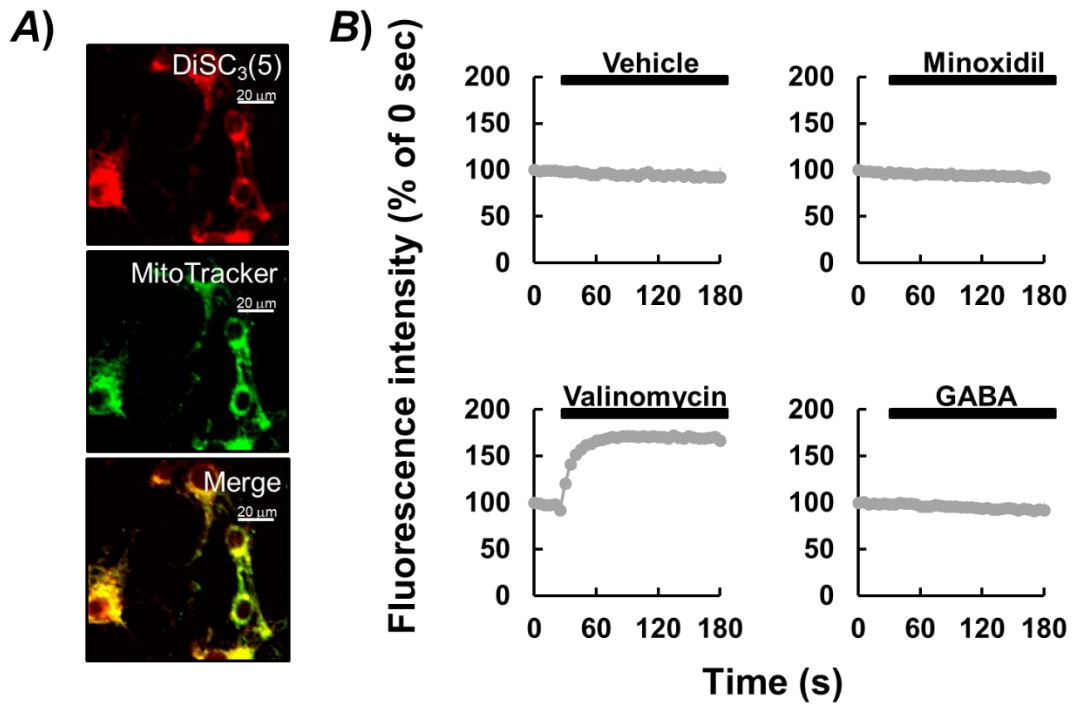
P : Primary neuron (cerebral cortex)

Fig.12. 大脳皮質神経細胞における ATP 感受性  $K^+$ チャンネル構成遺伝子の発現

成体大脳皮質組織 (T) 及び培養 8 日目のマウス胎児大脳皮質初代神経細胞 (P) より cDNA を調製し、RT-PCR によって ATP 感受性  $K^+$ チャンネルを構成する *Kir6.1*、*Kir6.2*、*SUR1*、*SUR2* の発現の検出を行った。増幅される塩基数はそれぞれ 196、293、168、166 bp となるようプライマーが設計された。(Fig.12. は文献 74 より引用した)

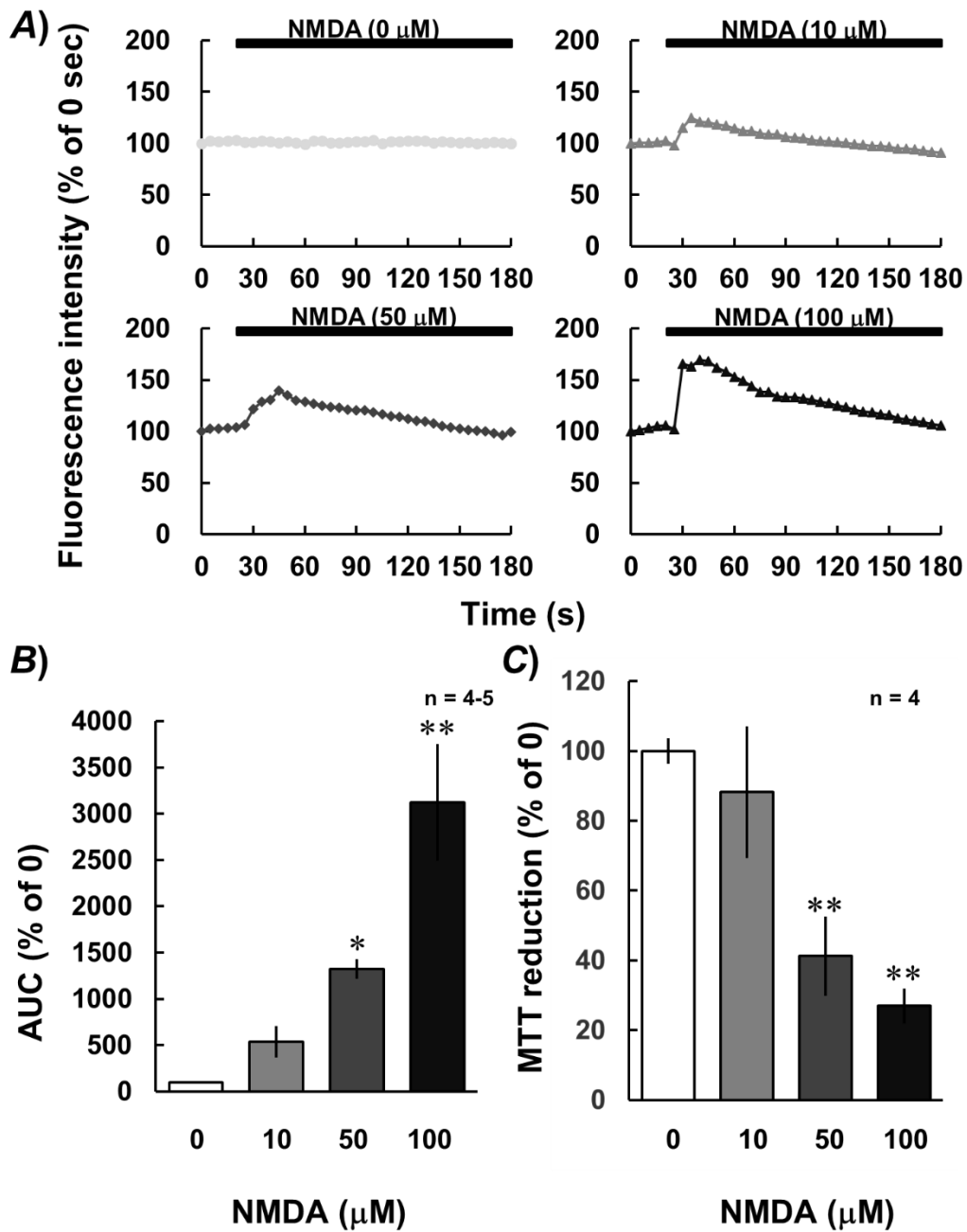
### 2.3.2. DiSC<sub>3</sub>(5)を用いたミトコンドリア膜電位変動の測定

初代培養神経細胞における薬物曝露に伴うミトコンドリア膜電位の変化をミトコンドリア膜電位指示薬である 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide [DiSC<sub>3</sub>(5)]を用いて測定した (Fig.13, 14)。まず、DiSC<sub>3</sub>(5) 及びミトコンドリアマーカー (MitoTracker) の共染色を実施したところ、DiSC<sub>3</sub>(5)の赤色蛍光は、ミトコンドリアマーカーの緑色蛍光とほとんどが一致していたことから、DiSC<sub>3</sub>(5)がミトコンドリアに局在していることが確かめられた (Fig.13A)。次に、DiSC<sub>3</sub>(5)を取り込ませた神経細胞に、細胞膜の膜電位を過分極させる GABA やミノキシジルを曝露したが蛍光強度に影響しなかった (Fig.13B)。一方、バリノマイシン曝露は DiSC<sub>3</sub>(5)蛍光強度を上昇させた。バリノマイシンは、細胞膜及びミトコンドリア内膜に K<sup>+</sup>透過性のポアを形成し K<sup>+</sup>イオノフォアとして作用する。つまりバリノマイシンは、細胞膜にポアを形成して K<sup>+</sup>排泄に伴う細胞膜電位の過分極を、ミトコンドリア内膜にポアを形成して K<sup>+</sup>流入に伴うミトコンドリア膜電位の脱分極を誘導する。しかしながら上述の通り、細胞膜電位の過分極を誘発する GABA やミノキシジル曝露は DiSC<sub>3</sub>(5)蛍光強度を変化させなかった。したがって、バリノマイシン曝露に伴う DiSC<sub>3</sub>(5)蛍光強度の増加は、細胞膜の膜電位の過分極ではなく、ミトコンドリアの脱分極が原因であることが示唆された。次に、DiSC<sub>3</sub>(5)を取り込ませた神経細胞に対して NMDA を曝露した (Fig.14A)。その結果 NMDA 曝露は、濃度依存性に一過性の蛍光強度上昇を起こした。NMDA 受容体の作動は細胞膜の Ca<sup>2+</sup>透過性を増加させるため、DiSC<sub>3</sub>(5)蛍光強度の変化は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加に伴うミトコンドリア内膜の脱分極であることが示唆された。我々は、NMDA 曝露に伴う一過性の DiSC<sub>3</sub>(5)蛍光強度の増加が、ミトコンドリア膜遷移孔 (PTP) 阻害剤であるサリチル酸及びシクロスポリンにより阻害されることを既に確認している (26)。したがって、NMDA 曝露に伴う細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加がミトコンドリア内膜の PTP を開口させて脱分極を誘発することが示唆された。NMDA 誘発性蛍光強度の曲線下面積 (AUC) を定量したところ、50 μM 以上の NMDA 曝露によって、有意に上昇した (Fig.14B)。また、これらの NMDA 曝露 24 時間後の MTT 還元能を測定し、NMDA 曝露に伴う神経細胞死を定量化した (Fig.14C)。その結果、50 μM 以上の NMDA 曝露は神経細胞の MTT 還元能を有意に減少させた。したがって、NMDA 曝露はミトコンドリア脱分極を誘発し、その程度が大きいほど、神経細胞死を引き起こす可能性が示唆された (Fig.14C)。



**Fig.13. 大脳皮質神経細胞におけるミトコンドリア内膜の脱分極**

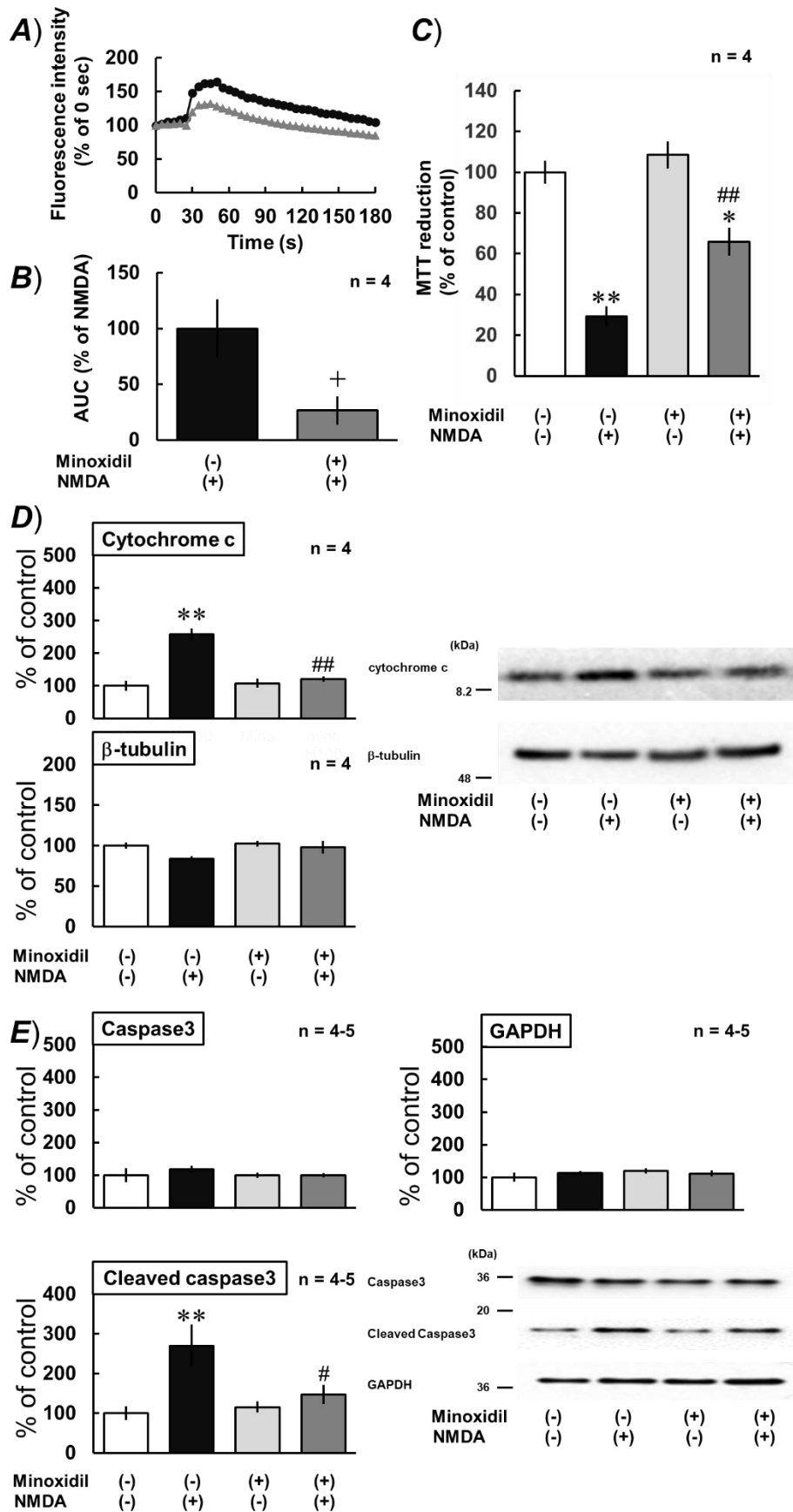
培養 8 日目のマウス胎児大脳皮質初代神経細胞におけるミトコンドリア膜電位指示薬である DiSC<sub>3</sub>(5)とミトコンドリア蛍光マーカーであるマイトトラッカーの共染色を実施した。スケールバーは 20 μm を示している。大脳皮質初代神経細胞に 250 nM の DiSC<sub>3</sub>(5)を取り込ませ、共焦点顕微鏡による経時的観察モード下、vehicle (HHBSS)、バリノマイシン (2 μM)、ミノキシジル (100 μM) 及びバクロフェン (500 μM) 存在下で蛍光強度の変化を測定した。(Fig.13. は文献 74 より引用した)



**Fig.14. 大脳皮質神経細胞に対する NMDA 曝露に伴うミトコンドリア脱分極及び細胞生存率への影響**  
 A) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞に DiSC<sub>3</sub>(5)を取り込ませ、共焦点顕微鏡による経時的観察モード下、0 から 100  $\mu\text{M}$  の異なる濃度の NMDA を曝露した。上段に示す線は、NMDA 曝露濃度を表している。  
 B) NMDA 曝露後の蛍光強度の変化に伴うスペクトルの曲線下面積 (AUC) を定量した。\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. 0 (Bonferroni's test). C) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞に 2 分間 NMDA を曝露し、フレッシュな培地に置き換えた 24 時間後、神経細胞の細胞生存率を MTT 還元能によって定量した。\*\* $p < 0.01$  vs. 0 (Bonferroni's test).

### 2.3.3. ミノキシジルによるアポトーシスシグナルの抑制

神経細胞に DiSC<sub>3</sub>(5)を取り込ませる 30 分間のインキュベートの最終 5 分間ミノキシジルを前処置した。その後、蛍光測定を開始し、NMDA を曝露に伴う蛍光強度の変化を測定した (Fig.15A)。その結果、ミノキシジル前処置は NMDA 曝露に伴う蛍光強度の変化の程度を小さくした。蛍光強度変化を表すスペクトルの曲線下面積 (AUC) を算出したところ、ミノキシジル曝露は AUC を有意に減少した (Fig.15B)。さらに、ミノキシジル前処置は NMDA 誘発性 MTT 還元能の低下を有意に反転した (Fig.15C)。ミトコンドリアの傷害は、ミトコンドリア内膜から細胞質へのチトクロム c 遊離を誘発し、遊離したチトクロム c は、カスパーゼ 9 と、さらに続くカスパーゼ 3 の活性化を引き起こし、アポトーシスを引き起こす。本研究においても NMDA 曝露は神経細胞の細胞質でのチトクロム c レベルを増加させ、活性型カスパーゼ (cleaved casapase3) レベルを増加させたが、ミノキシジル前処置はこれらの増加を有意に抑制した (Fig.15DE)。したがって、ミノキシジルは、NMDA 誘発性のミトコンドリア脱分極を抑制することで神経細胞のアポトーシスを抑制することが示唆された。



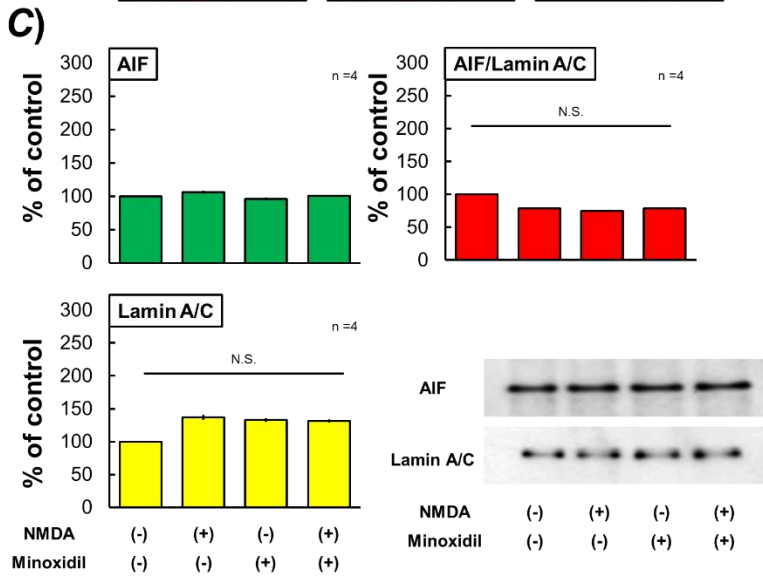
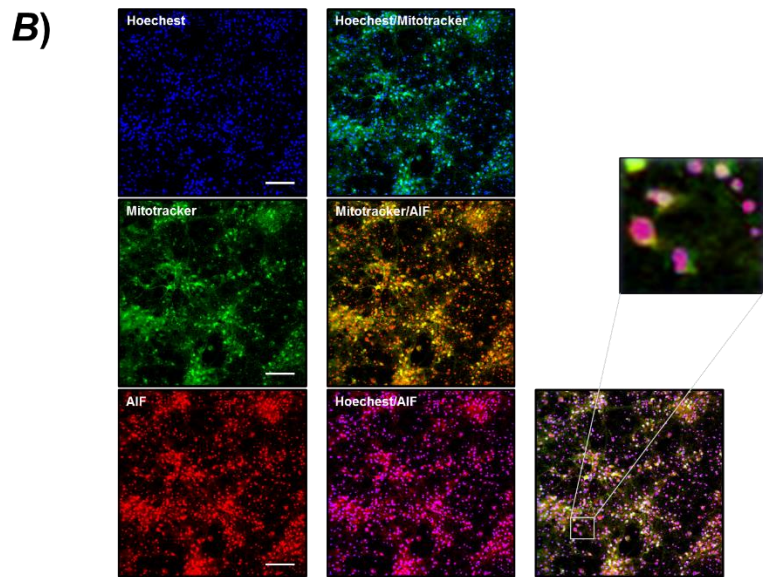
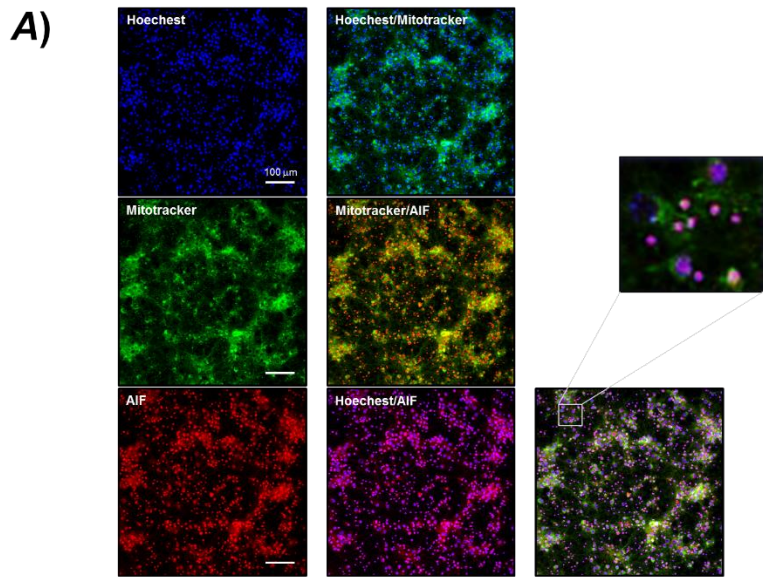


#### Fig.15. ミノキシジルによる神経細胞傷害抑制作用 (前のページ)

A) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞に DiSC<sub>3</sub>(5)を取り込ませる際、100  $\mu$ M ミノキシジルで 5 分間前処理したのち、共焦点顕微鏡による経時的観察モード下、100  $\mu$ M NMDA を曝露した。B) (A) のグラフにおける AUC を算出した。C-E) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞に 100  $\mu$ M NMDA を 2 分間曝露し、フレッシュな培地に置き換えた。C) 24 時間後、メディウムを交換し、その 24 時間後に細胞生存率を MTT 還元能によって測定した。DE) 6 時間後、アポトーシス誘導因子である、細胞質画分におけるチトクロム c の発現 (D) 及び活性型カスパーゼレベル (E) を検出した。B, \* $p < 0.05$  vs. NMDA alone (Student's t-test), C, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control experiment; ## $p < 0.01$  vs. 100  $\mu$ M NMDA alone (Bonferroni's test). D-E, \*\* $p < 0.01$  vs. control experiment; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. 100  $\mu$ M NMDA (Bonferroni's test). (Fig.15. は文献 74 より引用した)

#### 2.3.4. ミノキシジルによるカスパーゼ非依存性細胞死経路への影響

アポトーシス誘導因子 (AIF) は、チトクロム c と同様に通常ミトコンドリア内膜に局在して膜管腔の NADH 酸化酵素として機能する (44)。また AIF は、アポトーシス誘導シグナルの下流で活性化されたプロテアーゼにより切断されて細胞質に遊離した後、核へ移行し、核 DNA の断片化を引き起こすことで細胞死を誘導する。次に、NMDA を曝露した大脳皮質神経細胞を免疫化学的手法及び蛍光指示薬により細胞を染色し、AIF が NMDA 曝露依存的にミトコンドリアから核へ移行するか検討した (Fig.16)。その結果、核は Hoechst の青色、ミトコンドリアは緑色蛍光マーカー、AIF は免疫染色により赤色で検出した。重ね合わせるとミトコンドリアに局在する AIF は黄色で、核に局在する AIF は桃色に見えた。本研究で用いた神経細胞では、NMDA 非曝露条件下 (Fig.16A) でも、ミトコンドリアとの重ね合わせにより黄色に染まらない AIF 単独の赤いシグナルが確認され、また核との重ね合わせにより桃色に染まる AIF のシグナルが強く確認された。したがって、本研究で用いた神経細胞では通常条件でも AIF が核移行していることが判明した。NMDA 曝露条件下 (Fig.16B) でも同様に検出された。イムノブロット法により、核画分における AIF 発現を検出及び定量を試みたところ、AIF の発現は NMDA の有無に関わらず核に存在し、ミノキシジル前処置も変化を与えなかった (Fig.16C)。



#### Fig.16. NMDA 曝露に伴う AIF の核移行 (前のページ)

A-B) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞を溶媒または NMDA 曝露 6 時間後に固定し、核を Hoechst33342 の青色で、ミトコンドリアはマイトトラッカーの緑色で、AIF は免疫化学染色法により赤色で検出した。重ね合わせるとミトコンドリアに局在する AIF は黄色、核に局在する AIF は桃色に検出される。スケールバー=100  $\mu\text{m}$ 。C) 5 分間 100  $\mu\text{M}$  ミノキシジルを前処置した後、100  $\mu\text{M}$  NMDA を 2 分間曝露した神経細胞を 6 時間培養した後、核画分を調製して、イムノブロット法に適用した。Lamin A/C は核膜を構成するタンパク質でありポジティブコントロールとして用いた。

### 2.3.5. ミノキシジルによる細胞内 $\text{K}^+$ レベル減少作用

ミノキシジルは  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル開口薬として知られている。次に、FluxOR Potassium Ion Channel Assay kit (FluxOR) を用いて、 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル開口を検出し、その程度を定量的に解析した。本キットは神経細胞に、タリウムイオン ( $\text{Tl}^+$ ) 感受性の蛍光指示薬を取り込ませた後、細胞外培地に  $\text{Tl}^+$  を含ませた状態で  $\text{K}^+$  チャネルを開口させ、神経細胞への  $\text{Tl}^+$  の流入に伴う蛍光強度の増加を測定するものである (Fig.17AB)。まず、溶媒 (Vehicle) 処置では、 $\text{K}^+$  チャネルを開口させる薬物は含まれていないが、常時開口型の漏出チャネルを介した神経細胞への  $\text{Tl}^+$  の流入と考えられる、直線性の蛍光強度の増加が確認された (Fig.17A)。ミノキシジル処置では、FluxOR の蛍光強度を著明に増加させたため、ミノキシジルが  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル開口を促進したことが示唆された。これらのスペクトルの (240 秒間の) AUC を算出して比較したところ、ミノキシジル処置後の蛍光強度変動を示すスペクトルから求められる AUC は、Vehicle と比較して有意に増加した (Fig.17B)。次に、細胞質内  $\text{K}^+$  レベルを Asante potassium green-2 (APG2) により検出及び定量した (Fig.17CD)。APG2 をミノキシジルと共に 30 分間インキュベートさせたところ、APG-2 の蛍光強度は、Vehicle 処置と比較してミノキシジルの処置により低下し、細胞内  $\text{K}^+$  レベルを有意に減少させたことが示唆された。したがって、NMDA 誘発性ミトコンドリア脱分極には細胞内  $\text{K}^+$  レベルが関与し、ミノキシジルは確かに  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルを開口させ、細胞質内  $\text{K}^+$  レベルを低下させることで、ミトコンドリア PTP 開口に伴うミトコンドリアマトリックス内へ流入する陽イオン ( $\text{K}^+$ ) の程度を抑制することが示唆された。

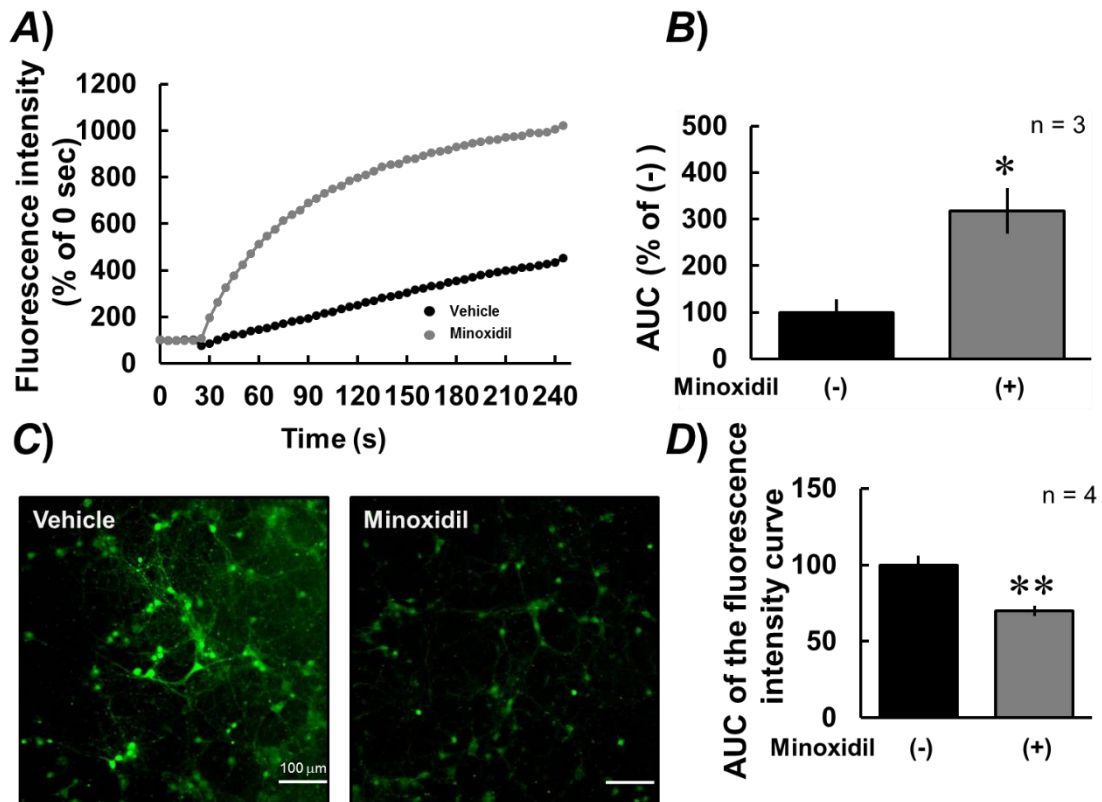


Fig.17. ミノキシジルによる K<sup>+</sup>チャネル開口による細胞内 K<sup>+</sup>量の減少

A) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞に FluxOR 蛍光色素を取り込ませ、共焦点顕微鏡による経時的観察モード下、TIを含む 100 μM ミノキシジル溶液を曝露した。B) (A) における AUC を定量化した。\**p* < 0.05 vs. vehicle. (Student's t-test) C) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞に 100 μM ミノキシジルを 5 分間処置した後に、APG-2 をさらに加えて 30 分間曝露後に共焦点顕微鏡下による蛍光写真撮影した。D) (C) における蛍光強度を定量化した。\*\**p* < 0.01 vs. vehicle (Student's t-test). (Fig.17. は文献 74 より引用した)

## 2.4. 考察

我々は以前 GABA<sub>B</sub> 受容体アゴニストバクロフェンが G タンパク質共役型内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネル (GIRK) を開口することで、NMDA 誘発性興奮性神経毒性を抑制したことを報告した (26)。しかしながら、ムシモールによる GABA<sub>A</sub> 受容体活性化に伴うクロライドイオンの細胞内流入は、NMDA 誘発性興奮性神経毒性を抑制しなかった。したがって、この神経保護作用は、バクロフェンによる過分極ではなく、細胞内 K<sup>+</sup>レベルの変動に伴うものだと考えられた (26)。つまり、細胞内 K<sup>+</sup>レベル変動がミトコンドリア脱分極の程度を決定することに寄与している可能性がある。本章の結果から、細胞膜上の K<sup>+</sup>チャネルを開口することは細胞内 K<sup>+</sup>レベルを減少させ、ミトコンドリアの脱分極を抑制し、カスパーゼ経路の活性化を抑制することで、アポトーシスを抑制することが示唆された。

ミトコンドリアは、小胞体と比較すると弱いですが、Ca<sup>2+</sup>緩衝作用を持ち、細胞内の Ca<sup>2+</sup>レベ

ルが高いときにミトコンドリア内に  $\text{Ca}^{2+}$  を汲み入れる (45)。一方で、ミトコンドリアへの過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  の汲み入れは、PTP 開口を誘導することで、カチオン勾配やミトコンドリア膜電位を消失させる (46)。この脱共役という現象はチロクロム c の放出を誘導し、カスパーゼ 9 の活性化を伴う活性型カスパーゼ 3 の発現を誘導する。(47)。したがって神経細胞内への過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、PTP を開口することで、ミトコンドリアに対し脱分極を誘導し、神経変性を引き起こす。ミトコンドリア内膜は、プロトン勾配の形成だけでなく、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{K}^+$  濃度勾配もあり、これらのイオンは細胞質に比べ、ミトコンドリアマトリックスの方が低い (48)。したがって PTP が開口するとこれら陽イオンすべてがマトリックス内に流入し、内膜を脱分極する。すなわち、本研究のように、神経細胞内  $\text{K}^+$  レベルを低下させることは、PTP 開口に伴う陽イオン、この場合  $\text{K}^+$ 、の流入を抑制し、ミトコンドリア傷害を介した神経細胞死から保護することに繋がる可能性が示唆される。

$\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルは組織によって異なるサブユニットを構成することが知られている。例えば、血管内皮細胞では SUR2B 及び Kir6.2、神経細胞では SUR1 及び Kir6.2、心筋細胞では SUR2A 及び Kir6.2 で構成されるヘテロオクタマーが発現している (49,50)。 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルは細胞膜及びミトコンドリア内膜のいずれにも存在するが、ミトコンドリア  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの機能及び構造については未だ完全に解明されていない (51,52)。本研究における初代大脳皮質神経細胞は活性化する  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルが発現している可能性があり (Fig.12)、加えてミノキシジルによる細胞質への  $\text{K}^+$  流入を確認した (Fig.16)。ミノキシジルはミトコンドリア内膜の脱分極を誘発しなかった (Fig.13)。おそらくミノキシジルは細胞膜透過性を持っていないか、もしくは本研究に用いた培養神経細胞にはミノキシジル応答性  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルがミトコンドリア内に存在しない可能性がある。いずれにしても、我々は本研究におけるミノキシジルの神経保護作用が細胞膜における  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル開口によるものと推定することができた。ミノキシジルの全身投与は血管内皮細胞弛緩に伴う血圧低下作用を示す。本研究において、ミノキシジルは脳虚血再灌流障害の急性期における神経変性への抑制効果が認められた。ロサルタンのような抗高血圧薬も脳虚血再灌流障害誘発性アポトーシスに対して保護作用があることから、我々は血圧降下作用によって脳虚血再灌流障害を保護するかどうかをさらに調査する必要がある。本研究は、ミノキシジルが脳虚血再灌流障害の急性期における神経障害を抑制したことから、ミノキシジルは血管内皮細胞を弛緩することによって、血液脳関門を通過するかもしれない。血液脳関門を通過するような  $\text{K}^+$  チャネル開口薬の開発は、神経変性疾患に対する新規治療に繋がるかもしれない。しかしながら、 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル活性化剤は心機能に対しても作用するため、大コンダクタンス型  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャネルのような中枢神経に特異的に局在するような受容体を標的とする必要がある。

神経細胞における AIF の核内移行は無処置条件下においても一定数の核内移行を認め、かつ、イムノブロット法による核画分における AIF 発現量は NMDA 処置の有無に関わら

ず一定であった。つまり、本実験系に用いたマウス初代大脳皮質神経細胞には、AIF が通常培養であっても、核に移行していることが示唆された。一方、AIF の核内移行が核の断片化を起こしているのかどうかは、エンドヌクレアーゼ活性を測定していないため不明である。Hoechst 染色像から NMDA 曝露によって核の断片化を示す所見が確認された。したがって、NMDA は AIF の発現量や核内移行に影響しないが、ミトコンドリアの機能障害を起因として、アポトーシスを誘導していることが示唆された。しかしながら、アポトーシスが起きていることを裏付けるには、核の断片化、エンドヌクレアーゼ活性等さらなる客観的事実の蓄積が必要である。またネクローシスが併発している可能性は明らかにすべきだろう。

## 第3章 ミノキシジルによる血圧低下作用が脳保護作用を示した可能性に関する検討

### 3.1. 序文

前章までの結果から、ミノキシジルは *in vivo*、*in vitro* のいずれの条件でも、興奮性神経毒性に対して神経保護作用を示すことが示唆された。一方、大脳皮質組織と大脳皮質初代培養神経細胞における  $K_{ATP}$  チャンネル構成遺伝子に違いが認められた。これは、大脳皮質を構成する細胞には神経細胞以外にグリア細胞 (39) や血管由来の細胞 (53) が含まれるためと考えられる。したがって、*in vitro* 条件下で認められた神経保護作用は神経細胞に直接的な作用と言えるが、*in vivo* 条件下で認められた神経保護作用は神経細胞以外の細胞への影響による結果かも知れない。ミノキシジルは当初血圧降下薬として開発が推し進められてきた薬物である。ミノキシジルの全身投与は、心臓に作用して心機能を減退し、血管に作用すると、血管内皮細胞に作用して間接的に、あるいは直接的に血管平滑筋に作用して、血管拡張作用を呈する (54)。ミノキシジルは  $K_{ATP}$  チャンネルを活性化するだけでなく、一酸化窒素 (NO) 供与剤としてはたらく可能性がある (Fig.18)。NO は血管平滑筋内の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、GTP からサイクリック GMP の生成と G キナーゼの活性化を介した血圧降下作用を示す (55)。前章の結果から、少なくともミノキシジルは *in vitro* 条件下、神経細胞内の  $K^+$  濃度低下作用が認められたが、心筋や血管平滑筋の細胞内  $K^+$  濃度低下作用により血圧低下は予想に難くない。さらに血圧低下は再灌流後の脳内の循環を緩徐にし、神経保護作用を示す可能性が否定することはできない。したがって、本章ではミノキシジル投与による血管拡張に伴う血圧降下作用に着目し、ミノキシジルを含む数種の薬物における血圧降下作用の測定及び、中大脳動脈結紮術、TTC 染色を用いて、ミノキシジルによる脳神経保護作用が血管拡張作用に伴うものかを検討した。



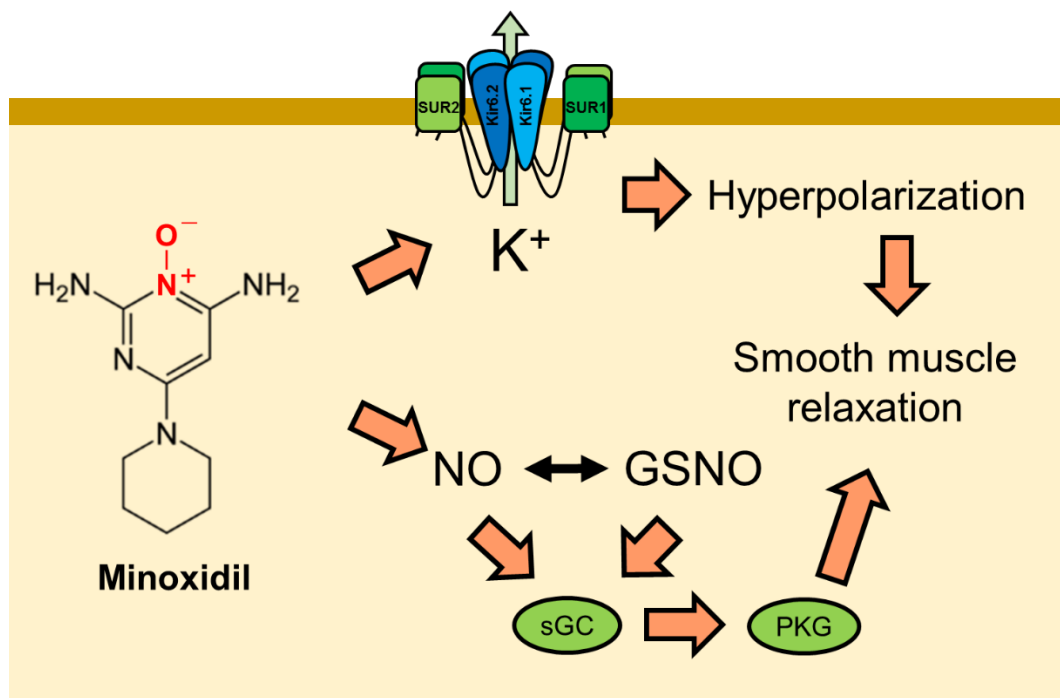


Fig.18. ミノキシジルにより活性化される経路

アドレナリン  $\alpha_1$  アンタゴニスト、 $\beta_2$  アゴニスト、アンギオテンシン変換酵素阻害剤及びアンギオテンシン受容体アンタゴニストは血管平滑筋弛緩に伴う血圧低下作用を引き起こす。また心機能減退作用に伴う血圧低下はアドレナリン  $\beta_1$  アンタゴニストにより誘引可能である。その他利尿薬により血液量を減らすことで血圧を下げる事が出来る。本章では、ミノキシジルに伴う血圧低下作用を比較するポジティブコントロールとして、 $\alpha_1$  受容体アンタゴニストであるドキサゾシン、 $\alpha\beta$  受容体阻害薬であるカルベジロール及びアンギオテンシン受容体阻害薬であるロサルタンを用いた。

## 3.2. 方法

### 3.2.1. 動物

2.2.2. に準じて飼育を行った。

### 3.2.2. 試薬

ミノキシジルは富士フィルム和光純薬社、ドキサゾシンは Toronto chemical research 社、ロサルタン、カルベジロール Sigma Aldrich 社は、いずれも標準グレードのものを使用した。



### 3.2.3. 血圧測定

ミノキシジル、ドキサゾシン、ロサルタン、カルベジロールは生理食塩水を用いて溶解した。C57/BL6 雄性マウス 6-10 週齢に対して生理食塩水、ミノキシジル (0.5 または 5 mg/kg b.w.)、ドキサゾシン (2 mg/kg b.w.)、ロサルタン (30 mg/kg b.w.) またはカルベジロール (2 mg/kg b.w.) を尾静脈より急速静注し、暴れないようにマウスを固定し、保温器を用いて、マウス体温を一定にした後、血圧測定用カフセンサーを用いて、尾動脈における最高血圧、平均血圧、最低血圧、心拍数を計測した。これらは、尾静脈内投与から 15 分間隔で 60 分間及び 180 分後に BP98A-L (ソフトロン) を用いて測定した。

### 3.2.4. 中大脳動脈結紮術 (MCAO)

1.2.3. に準じて施術した。

### 3.2.5. TTC 染色

1.2.4. に準じて染色した。

### 3.2.6. データ解析

TTC 染色の変化は ImageJ にて定量した。TTC 染色の関心領域 (ROI) は左右大脳半球をそれぞれ覆うように定義された。その上で画像中各ドットのシグナル強度を数値化した。すべてのデータは平均値±標準誤差で示し、Dunnett's test または Bonferroni's test により有意差検定を実施した。

## 3.3. 結果

### 3.3.1. 各薬物による尾動脈血圧降下作用

C57/BL6 雄性マウスに対して、生理食塩水 (対照)、ミノキシジル (0.5 mg/kg or 5 mg/kg)、カルベジロール (2 mg/kg)、ドキサゾシン (2 mg/kg)、ロサルタン (30 mg/kg) またはドキサゾシン (2 mg/kg) とロサルタン (30 mg/kg) の混合液 (ドキサゾシン/ロサルタン混合) を急速静脈内投与したのち、経時的に血圧測定を行った (Fig.19)。

最高血圧 (SBP) (Fig.19A) は、対照群では投与後 3 時間、血圧は約 110 mmHg のまま変動しなかった。一方、0.5 mg/kg ミノキシジル投与群では投与 15 分後に約 60 mmHg まで有意に低下したが、投与 180 分後までに元に戻った。5 mg/kg ミノキシジル投与群で投与 15

分後までに約 50 mmHg まで有意に低下し、この低下は少なくとも 180 分後まで継続した。ドキサゾシン投与群またはロサルタン投与群でも有意な血圧低下が認められたが、血圧低下は一過性であり、投与 180 分後までに元に戻った。カルベジロール投与群は多少の血圧低下があるものの、有意差は認められなかった。ドキサゾシン/ロサルタン混合投与群では、その降下作用が各単独投与群と比較してさらに強く、ミノキシジルと同程度の約 50 mmHg まで血圧降下作用を示し、またこの血圧降下作用は少なくとも 180 分間継続した。

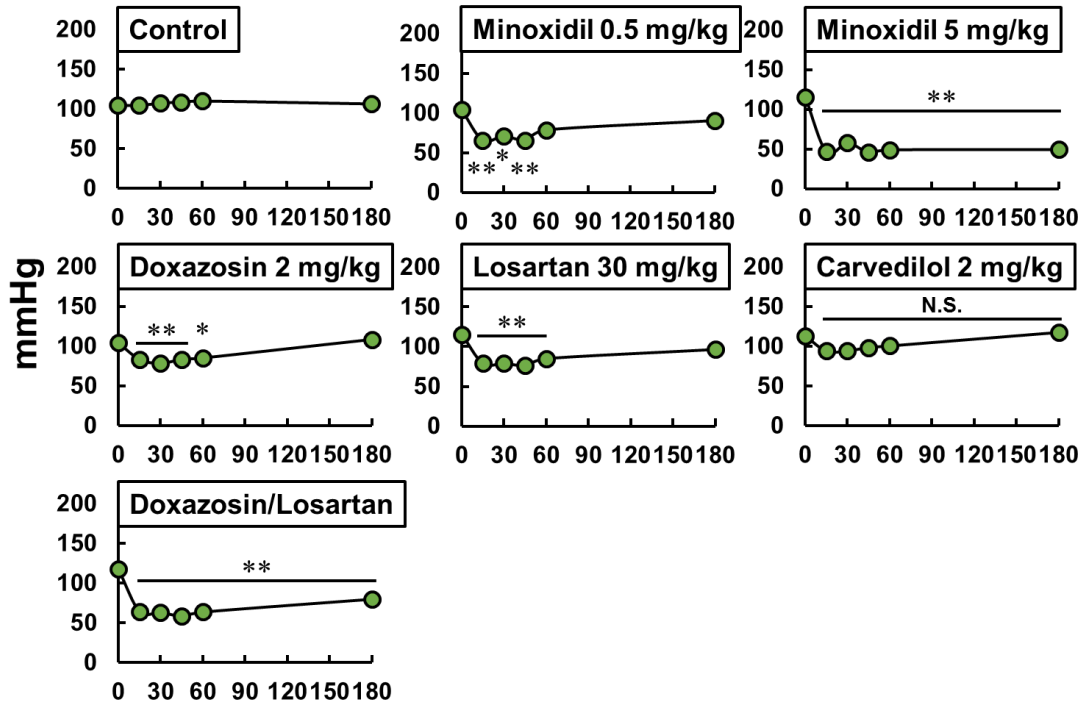
最低血圧 (DBP) は、ドキサゾシン、ロサルタン投与群は一過性に約 40 mmHg まで血圧を低下させたが、有意な差は認められなかった。一方で、ミノキシジル、ドキサゾシン/ロサルタン混合投与群は SBP と同じように単独投与群と比較していずれも強力に血圧低下作用を示したが、ミノキシジル投与群には有意な差は認められなかったのに対して、ドキサゾシン/ロサルタン混合投与群は投与 1 時間まで有意な血圧低下作用を示した。一方で、カルベジロール投与群は、最低血圧には影響を与えなかった (Fig.19B)。

平均血圧は、SBP と同様に、ドキサゾシン、ロサルタン単独投与群においては、投与 45 分及び 60 分後までの有意な血圧降下作用が認められたのに対して、ミノキシジル、ドキサゾシン/ロサルタン混合投与群においては、血圧降下作用がさらに強力に認められ、約 40-60 mmHg にまで低下させ、その持続時間は 180 分間持続した (Fig.19C)。

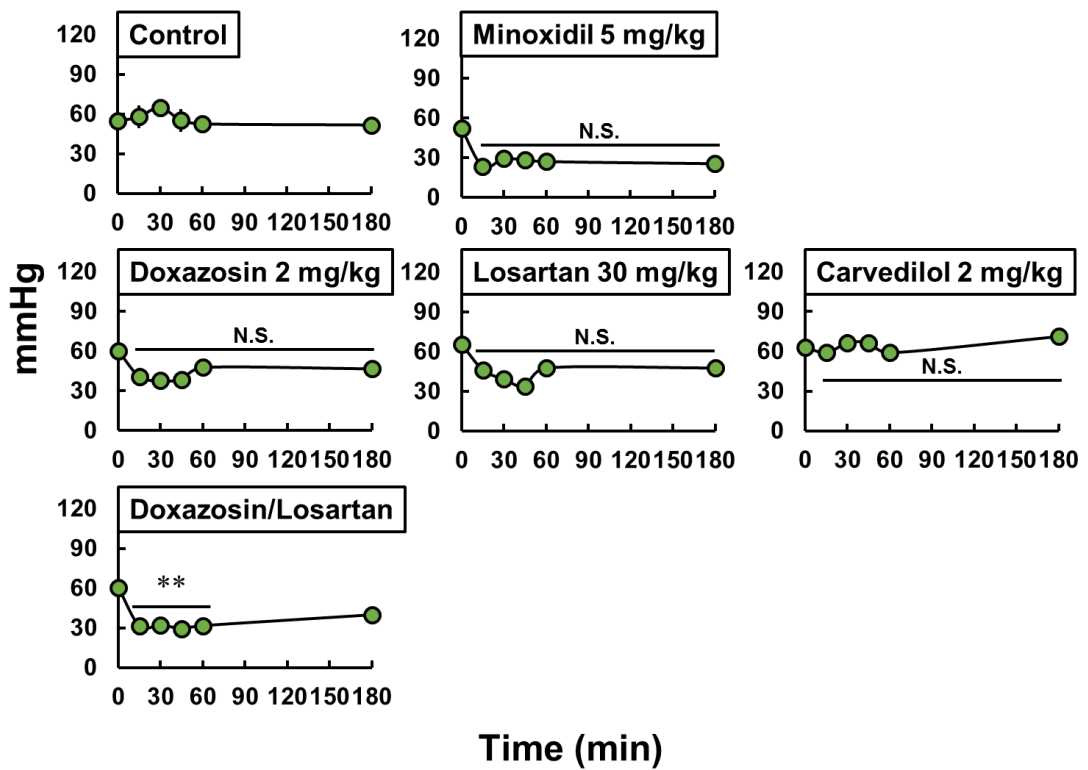
### 3.3.2. 各薬物投与群における心機能変化

次に、心拍数への影響を検討した (Fig.19D)。対照群及びミノキシジルを除く降圧薬単独投与群において、血圧測定期間内における心拍数の有意な変化は確認できなかった。しかしながら、ミノキシジル投与群 (5 mg/kg) 及びドキサゾシン/ロサルタン混合投与群においては、有意差は認められなかったが心拍数は約 1.5 倍に増加する傾向が認められた。

## A) Blood pressure SBP

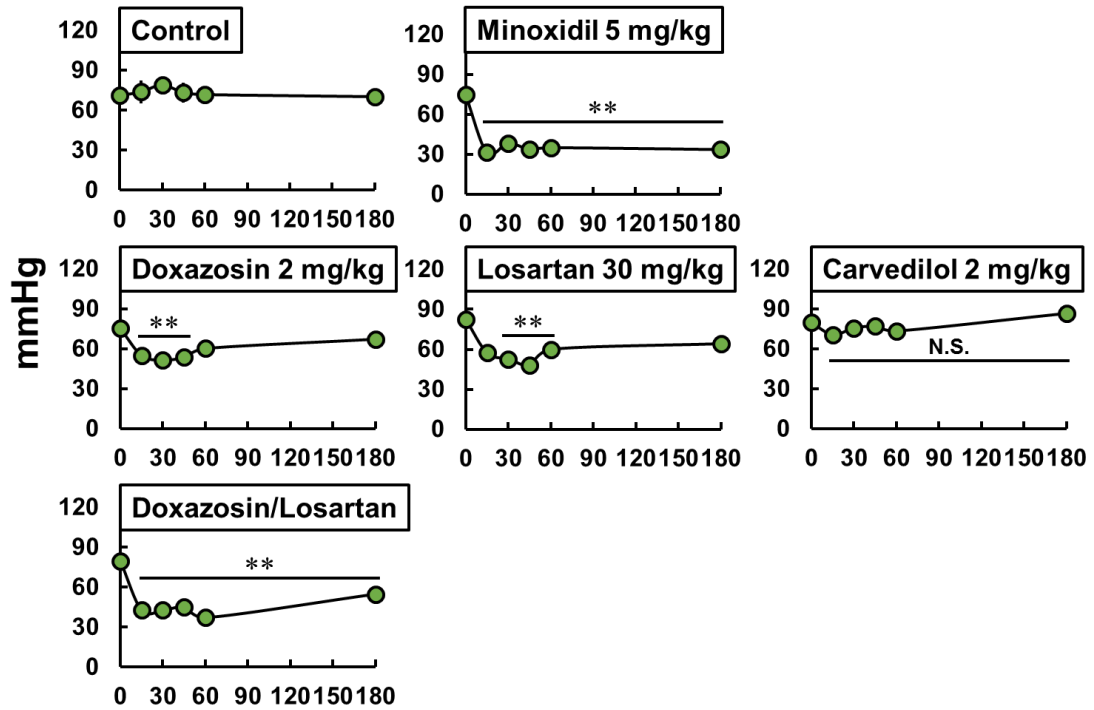


## B) Blood pressure DBP

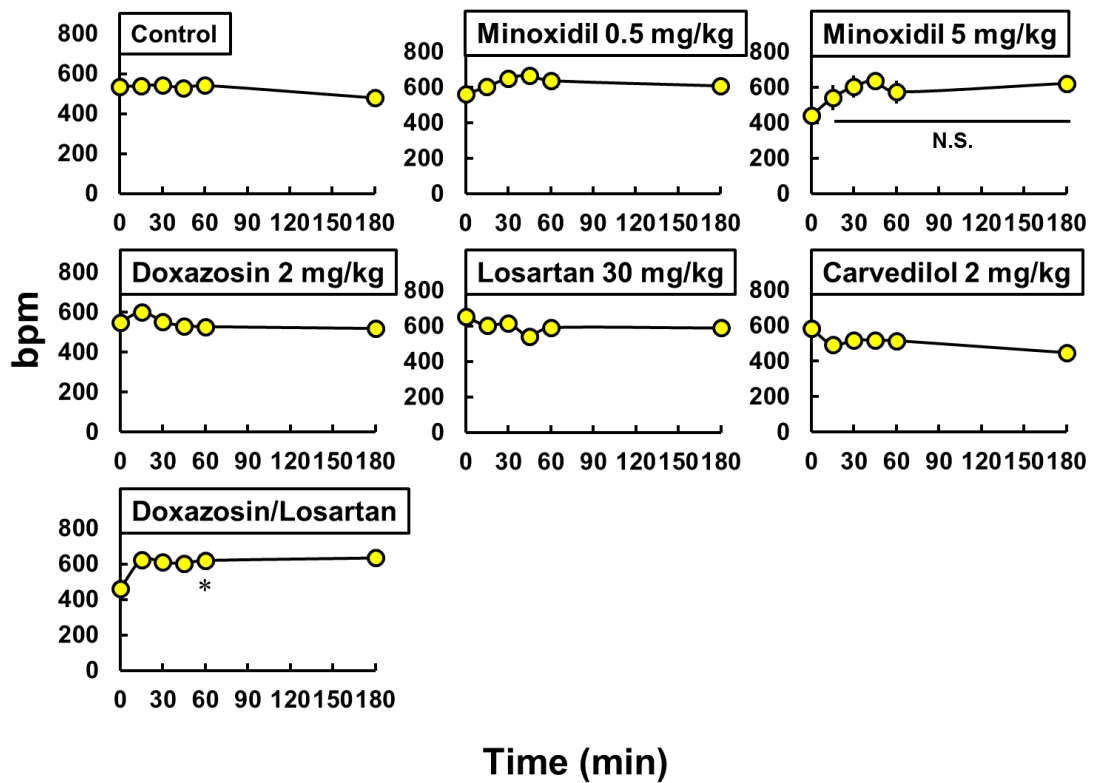


Time (min)

### C) Blood pressure MBP



### D) Heart rate

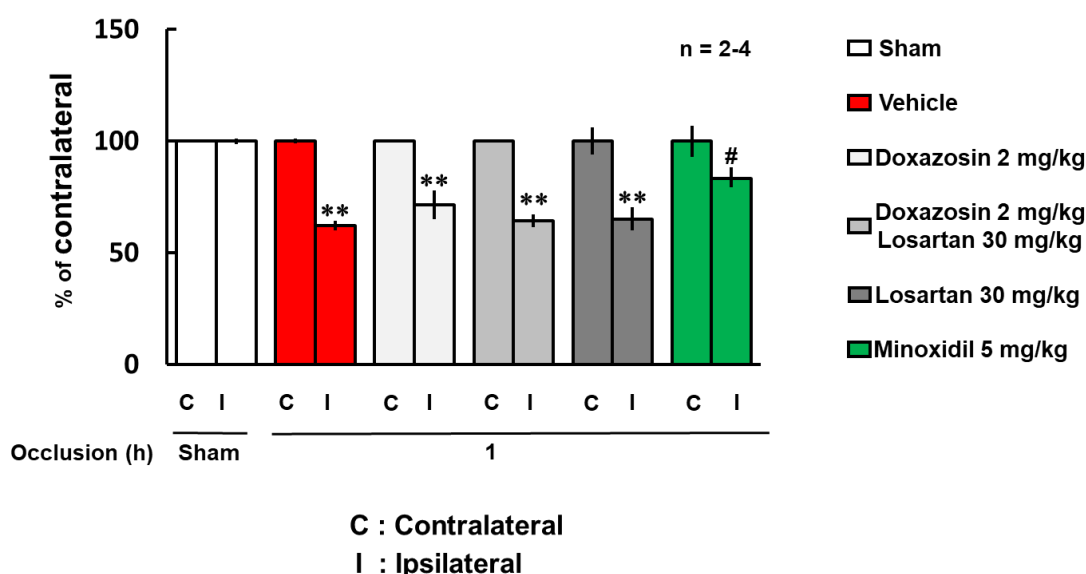


**Fig.19. 各薬物投与による血圧・心機能の変動**

ミノキシジル (0.5、5 mg/kg b.w.)、ドキサゾシン (2 mg/kg b.w.)、ロサルタン (30 mg/kg b.w.)、カルベジロール (2 mg/kg b.w.) を生理食塩水に溶解後、尾静脈より急速投与し、投与後 180 分までの (A) 最高血圧、(B) 最低血圧、(C) 平均血圧、(D) 心拍数を BP-98A-L を用いて評価した。\*\* $p < 0.01$  vs 0 min (Dunnett's test).

### 3.3.3. 血圧降下作用と梗塞巣減少作用の相関性

次に、これら降圧薬の投与が、ミノキシジルと同様に、MCAO 後の神経傷害を抑制するか検討した (Fig.20)。その結果、前章までと同様に偽手術 (Sham) 群では両側とも TTC 染色で同様に赤く染まったが、MCAO により 1 時間脳虚血負荷すると反対側 (C) に比べ、同側 (I) の TTC 染色が有意に減少した (Vehicle)。また 5 mg/mL ミノキシジル投与群ではこの減少が有意に抑制された。しかしながら、他の降圧薬投与群では TTC 染色される領域は増えなかった。したがって、ミノキシジルの中枢神経傷害抑制作用は血圧低下作用とは異なる機構であることが示唆された。



**Fig.20. MCAO 手術に伴う虚血性神経組織傷害に対する各降圧薬前処置の効果**

6 週齢の C57/BL6 マウスに 1 時間の MCAO 手術を施すとともに、ミノキシジル (5 mg/kg b.w.)、カルベジロール (2 mg/kg b.w.)、ドキサゾシン (2 mg/kg b.w.)、ロサルタン (30 mg/kg b.w.) またはドキサゾシン (2 mg/kg b.w.) とロサルタン (30 mg/kg b.w.) の混合液を投与した。再灌流 24 時間後脳を取りだし、直ちに 1000 μm の厚さでスライスを調製し、TTC 染色を実施した。各スライスの半球毎の TTC 染色の程度を定量し、梗塞した同側 (Ipsilateral : I) 及び反対側 (Contralateral : C) の半球間の染色の程度を比較した。\*\* $P < 0.01$  vs contralateral; # $P < 0.05$  vs vehicle experiment (Bonferroni's test).

### 3.4. 考察

前章において、ミノキシジルは NMDA 受容体刺激に伴う神経細胞の過剰興奮に対して抑

制的に作用する可能性が示唆された。その機序として、ミノキシジルは細胞内  $K^+$  レベルを減少させることに起因するミトコンドリア脱分極を抑制することが示された。一方で、*in vivo* では、血液脳関門を構成する血管内皮細胞や平滑筋細胞にミノキシジルが作用する可能性もある。血管内皮細胞における  $K_{ATP}$  チャンネル構成因子は Kir6.2 及び SUR2B のヘテロオクタマーが発現していることが報告されている (56)。または、ミノキシジルは NO を遊離して血管平滑筋を弛緩しているかもしれない (Fig.18, 19)。したがって、ミノキシジルは血管平滑筋が弛緩し、血圧を低下させることが神経保護作用の本質かもしれない。事実、本章の結果より、ミノキシジルの投与量では、最高血圧 (SBP) が有意に低下し、少なくとも 180 分間持続することが示された (Fig.19)。したがって、同様に血圧降下作用を示す、 $\alpha_1$  受容体阻害薬であるドキサゾシン、アンジオテンシン受容体阻害薬であるロサルタン、 $\alpha\beta$  阻害薬であるカルベジロールを用いて同程度の血圧降下作用を示す薬剤の探索を試みた。その結果、これら薬物はいずれにおいても、血圧降下作用を示したが、その降下作用はミノキシジルと比較して脆弱なものであった。一方で、ドキサゾシン及びロサルタンの同時投与はミノキシジルと同程度の血圧降下作用を示した (Fig.19)。Fig.19 で示した薬物を用いて、MCAO 処置直後に急速静脈内投与を行うことで、血圧降下作用を誘発し循環血液量を増大させた。しかしながら、ドキサゾシン、ロサルタン単独投与群及び併用投与群、カルベジロール投与群において、脳梗塞巣の減少は確認することが出来なかった (Fig.20)。特にドキサゾシン/ロサルタン混合液投与群ではミノキシジル投与群と同等以上の血圧低下作用を認めたが、脳梗塞層の減少は認められなかった。したがって、*in vivo* におけるミノキシジルの神経保護作用は血圧に対する作用ではないことが示唆された。

## 第4章 $K_{ATP}$ チャンネル開口阻害薬によるミノキシジルの神経保護作用に対する効果

### 4.1. 序文

前章までに、ミノキシジルの興奮性神経毒性に対する神経保護作用は、血圧降下作用ではなく、細胞内  $K^+$  レベル低下に起因することが示唆された。 $K_{ATP}$  チャンネルは細胞膜に存在し、常時開口型のチャンネルとして細胞内  $K^+$  の排出により静止膜電位の形成に寄与する (57) だけでなく、ミトコンドリア内膜上にも  $K_{ATP}$  チャンネルが存在する (58)。ミトコンドリア内膜の  $K_{ATP}$  ( $mK_{ATP}$ ) チャンネルは、ミトコンドリアマトリクスから細胞質画分へ  $K^+$  を輸送することで膜電位形成に関与する (48)。心筋細胞の  $mK_{ATP}$  チャンネルを遮断すると電子伝達系複合体 1 及び 2 を阻害して、ATP 合成酵素を阻害する (52)。しかしながら  $mK_{ATP}$  チャンネルの機能や構成するサブユニット等には未だ不明な事が多い。また、ミノキシジルは前章においても記載したが、構造内に NO を持ち、NO 遊離作用を有するため、本実験に関しても、ミノキシジルにおける神経保護作用が NO シグナルに起因することは否定することが出来ない。したがって、ミノキシジルにおける興奮性神経毒性に対する保護作用が、細胞膜上  $K_{ATP}$  チャンネル機能亢進に伴うものであり、かつ NO シグナルに起因しないことを立証するため  $K_{ATP}$  チャンネル阻害実験を試みることにした。本章では、細胞膜上  $K_{ATP}$  チャンネルを特異的に阻害する HMR1098、ミトコンドリア内膜  $K_{ATP}$  チャンネル特異的阻害薬 (5-Hydroxydecanoic acid : 5-HD)、非選択的阻害薬 (グリベンクラミド) を用いて第 2 章におけるミノキシジルの神経保護作用をキャンセルするか検討した。

### 4.2. 方法

#### 4.2.1. 薬物

グリベンクラミド、ミノキシジルは富士フィルム和光純薬社、5-Hydroxydecanoic acid sodium salt は Sigma Aldrich 社、HMR1098 は Axon Medchem 社、NMDA はナカライテスク社のいずれも標準グレードのものを使用した。

#### 4.2.2. 動物

1.2.2. に準じて飼育した。

### 4.2.3. MCAO

1.2.3.に準じて飼育した。

### 4.2.4. TTC 染色

1.2.4.に準じて染色した。

### 4.2.5. 初代大脳皮質神経細胞培養

2.2.3.に準じて培養した。

### 4.2.6. K<sup>+</sup>チャネル開口と細胞内 K<sup>+</sup>レベルの測定

2.2.6.に準じて測定した。

### 4.2.7. MTT 還元能の測定 (MTT Assay)

2.2.7.に準じて測定した。

### 4.2.8. 蛍光指示薬による細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベル測定

NMDA によるカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) の細胞内流入を確認するため、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬である Fluo4 を用いた。Fluo4、プロベネシドを含むローディングバッファーに置換し、30 分間インキュベーションを行った。写真及び連続撮影は FluoView™ FV1000 共焦点顕微鏡で行った。連続撮影は撮影間隔 5 秒間で 36 枚つまり 180 秒間撮影を行った。撮影開始 30 秒間はバックグラウンドとして撮影し、その後 HHBSS に溶解した NMDA を最終濃度 100 μM になるように添加した。Fluo4 の励起波長は 488 nm であり、発光波長は 520-560 nm で検出を行った。

### 4.2.9. データ解析

TTC 染色及び蛍光強度の変化は ImageJ にて定量した。蛍光強度の変化の定量では、ノイズ以外すべての領域を関心領域 (ROI) と定義した。その上で画像中各ドットのシグナル強度を数値化した。すべてのデータは平均値±標準誤差で示し、Student's t-test または



Bonferroni's test により有意差検定を実施した。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. ミノキシジルによる NMDA 受容体作動に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 流入に対する影響

マウス初代大脳皮質神経細胞に NMDA を曝露することに伴う細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を蛍光指示薬 Fluo4 を用いて測定した (Fig.21)。しかしながら、ミノキシジル前処置は NMDA 曝露に伴う細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量を変化させなかった。

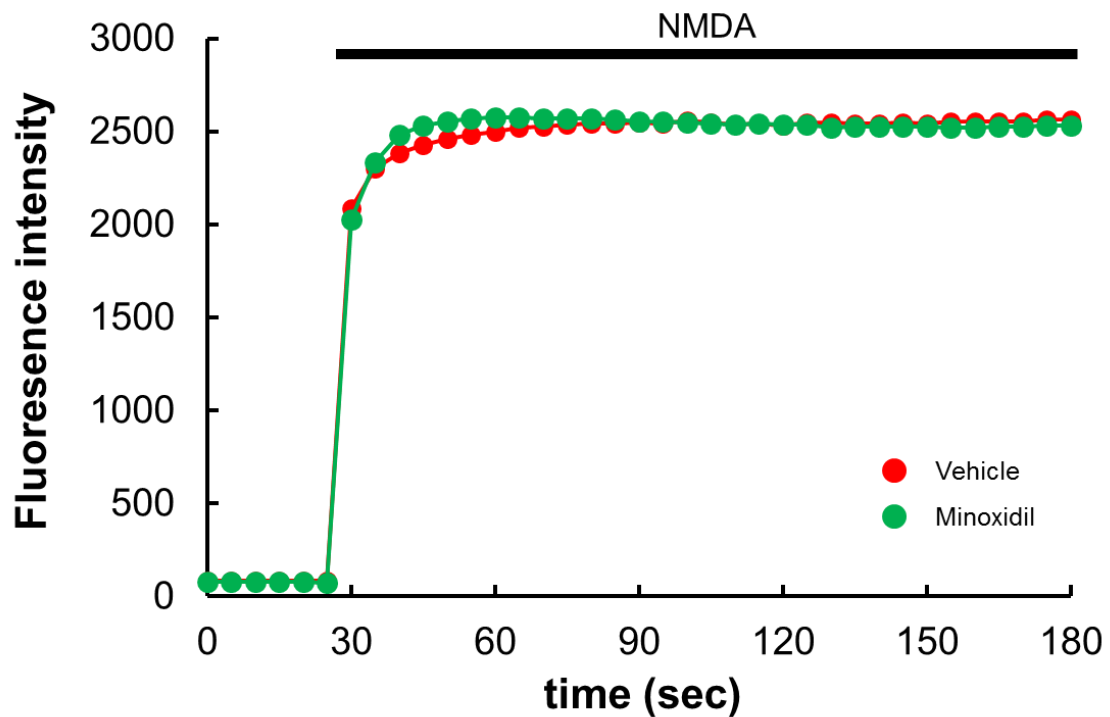
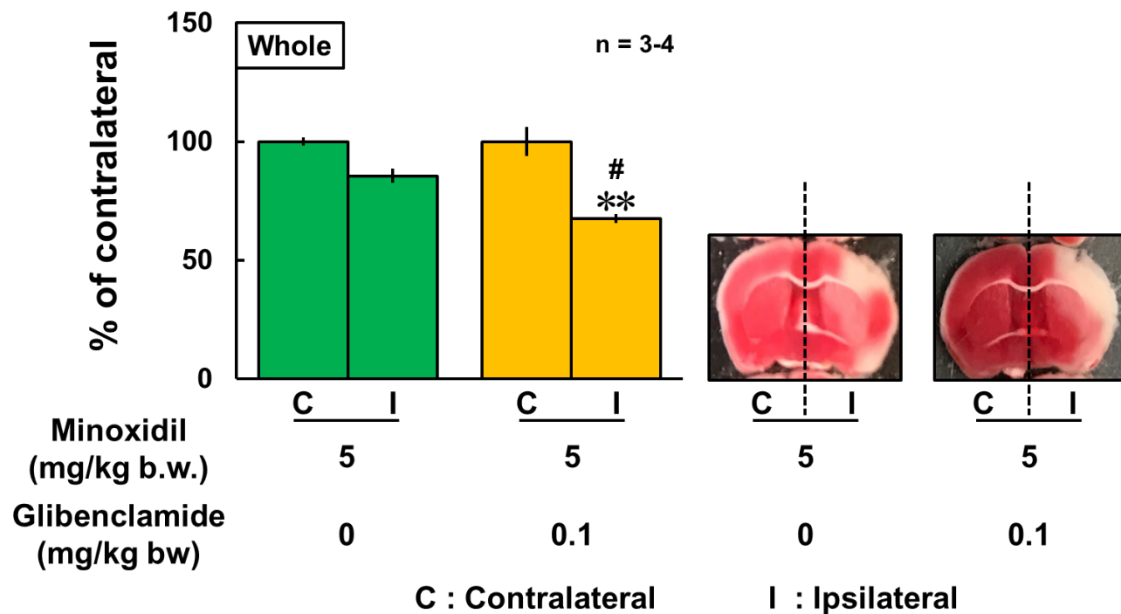


Fig.21.  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング蛍光色素を用いたミノキシジルの NMDA 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入への影響  
培養 8 日目の大脳皮質神経細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fluo4 を 30 分間インキュベートして取り込ませた。100  $\mu\text{M}$  ミノキシジル前処置は最終 5 分間インキュベートした。共焦点顕微鏡による経時的観察モード下、100  $\mu\text{M}$  NMDA を曝露し  $\text{Ca}^{2+}$  流入による蛍光強度変化を測定した。

### 4.3.2. グリベンクラミドによるミノキシジルの神経保護作用への影響

MCAO 処置 2 時間前に  $K_{ATP}$  チャンネル非選択的阻害薬グリベンクラミドを腹腔内投与 (0.1 mg/kg b.w.) し、前章までと同様に MCAO による 1 時間脳虚血負荷を実施するとともにミノキシジル (5 mg/kg b.w.) を静脈内へ投与した (Fig.22)。再灌流 24 時間後の TTC 染色の結果、ミノキシジルにおける神経保護作用は、グリベンクラミドによって有意に抑制された。



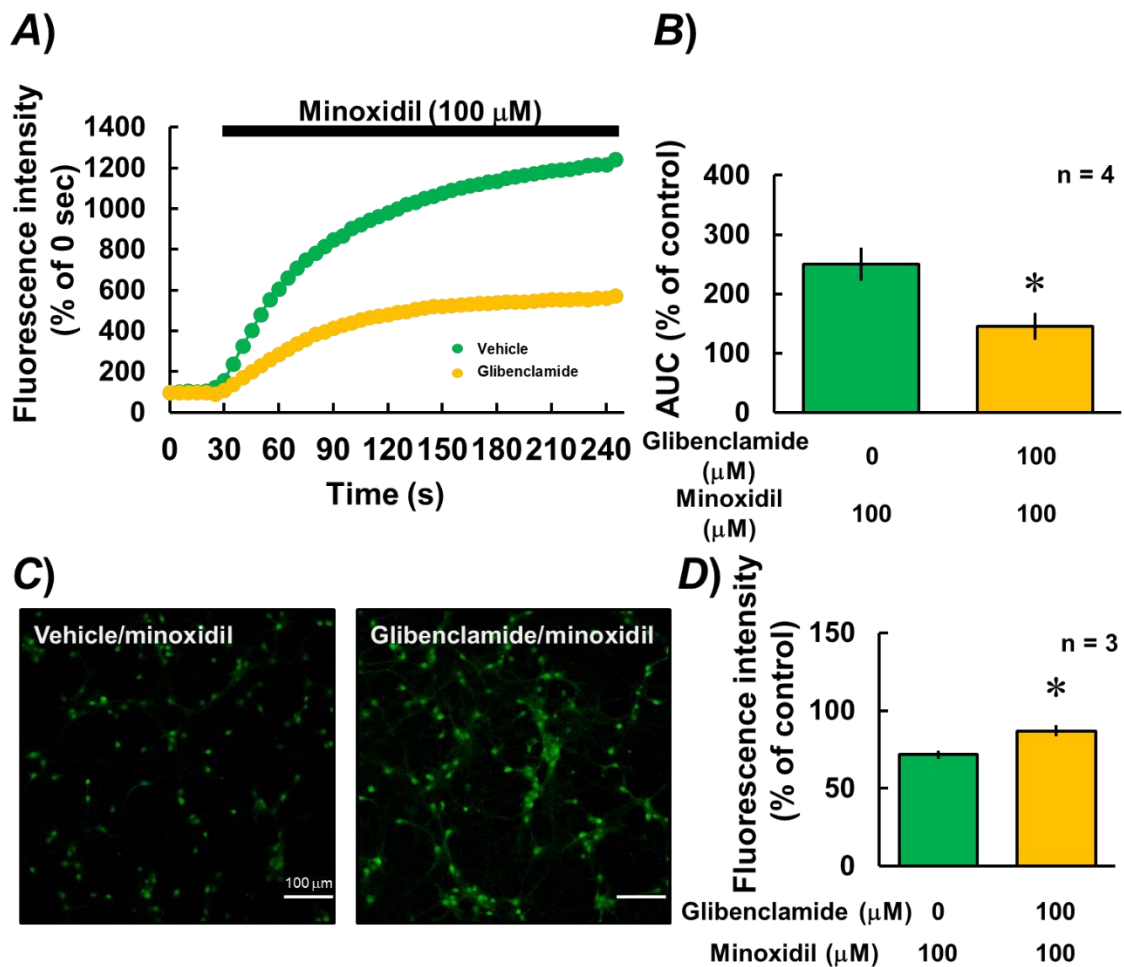
**Fig.22.  $K_{ATP}$  チャンネル特異的阻害薬グリベンクラミドによるミノキシジルの保護作用の反転**  
 グリベンクラミド (0.1 mg/kg b.w.) を腹腔内投与した 2 時間後、MCAO による脳虚血負荷を実施した。ミノキシジル (5 mg/kg b.w.) は梗塞負荷直後に尾静脈より急速投与した。再灌流 24 時間後に脳を摘出し、直ちに 1000  $\mu$ m の厚さでスライスを調製し、TTC 染色を実施した。各スライスの半球毎の TTC 染色の程度を定量し、梗塞した同側 (Ipsilateral : I) 及び反対側 (Contralateral : C) の半球間の染色の程度を比較した。  
<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  vs. contralateral; <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. minoxidil (Bonferroni's test). (Fig. 22. は文献 74 より引用した)

### 4.3.3. 培養細胞における $K^+$ チャネル開口頻度および細胞内 $K^+$ レベル変動に対するグリベンクラミドの影響

$K_{ATP}$  チャネル非選択的阻害薬であるグリベンクラミドを、培養神経細胞に 30 分間前処置し、ミノキシジルおよび TI を含む刺激溶液を測定開始 30 秒の時点で適応した際の蛍光強度の変化を、共焦点顕微鏡により経時的に測定した。(Fig.23)。適応後 220 秒間  $K^+$ チャネル開口に伴う TI の流入を測定した結果、ミノキシジル単独条件においては蛍光強度を約 1200% まで増大させた。一方で、グリベンクラミドの前処置はミノキシジル誘導性蛍光強度の増大をおおよそ 500% まで低下させた。加えて、 $K_{ATP}$  チャネル開口に伴う細胞内  $K^+$ レベルの低下を Asante potassium green-2 AM (APG-2) を用いて検討した。その結果、グリベンクラミド・ミノキシジル共曝露群ではミノキシジル単独曝露における細胞内  $K^+$ レベルと比較して、有意に増加させた。したがってグリベンクラミドは、ミノキシジルによる  $K_{ATP}$  チャネル開口を介した  $K^+$ 排泄機構を阻害することで、細胞内  $K^+$ レベルを増加させることが示唆された。

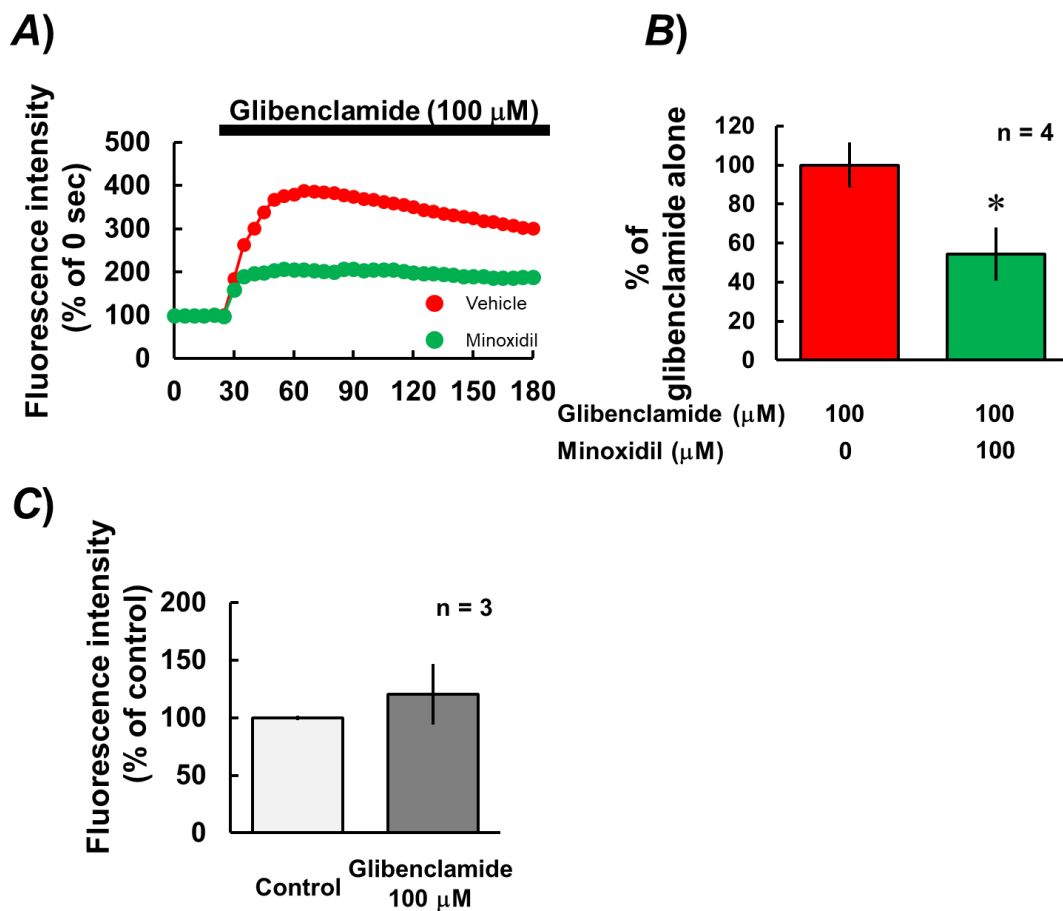
### 4.3.4. グリベンクラミド単独曝露による神経興奮作用

培養神経細胞にミノキシジルを前処置し、グリベンクラミドを培養神経細胞に曝露した際の神経細胞内への  $Ca^{2+}$ 流入を蛍光指示薬 Fluo4 を用いて測定した (Fig.24)。その結果、グリベンクラミド単独では神経細胞内への  $Ca^{2+}$ 流入が認められ、これはミノキシジル前処置により有意に抑制された (Fig.24AB)。したがって、ミノキシジルはグリベンクラミドの作用を遮断することが確認された。また、グリベンクラミドを APG とともに 30 分間曝露したまま細胞質内  $K^+$ レベルを検出及び定量したところ、細胞内  $K^+$ レベルは増加傾向にあるものの、ばらつきが大きく有意差は付かなかった (Fig.24C)。したがって、グリベンクラミドは神経細胞を脱分極する作用があるため、脱分極につづく電位依存性  $K^+$ チャネル開口に伴う細胞内  $K^+$ レベル変動がおこることが示唆された。



**Fig.23. グリベンクラミドによる  $K_{ATP}$  チャンネル開口阻害作用**

A, B) 培養 8 日目の大脳皮質神経細胞に FluxOR 蛍光色素を取り込ませ、グリベンクラミドを 10 分間前処置した。共焦点顕微鏡による経時的観察モード下、 $TI^{-}$ を含む 100 μM ミノキシジル溶液を曝露した。B) (A) による AUC を定量した。\* $p < 0.05$  vs. vehicle. (Student's t-test). C) 培養 8 日目の大脳皮質初代神経細胞に 100 μM グリベンクラミドを 10 分間前処置し、100 μM ミノキシジルを加え 5 分間共曝露した。さらに APG-2 を加えて 30 分間曝露後に共焦点顕微鏡下による蛍光写真撮影した。D) (C) における蛍光強度を定量し、比較検討した。\* $p < 0.05$  vs. minoxidil alone (Student's t-test). (Fig.23. は文献 74 より引用した)



**Fig.24. グリベンクラミドによる脱分極に伴うカルシウム流入、細胞内 K<sup>+</sup>変動**

A) 培養 8 日目の大脳皮質神経細胞に Fluo4 を取り込ませる際、ミノキシジルまたは溶媒を前処置し、共焦点顕微鏡観察下で 100 μM グリベンクラミドを曝露し、細胞内カルシウム流入を測定した。B) (A) による AUC を定量して比較した。\* $p < 0.05$  vs. glibenclamide alone. (Student's t-test). C) 大脳皮質初代神経細胞に 100 μM グリベンクラミドを 10 分間前処置した後に、APG-2 をさらに加えて 30 分間曝露後に共焦点顕微鏡下による蛍光写真撮影し蛍光強度を定量化した (Student's t-test)。 (Fig.24. は文献 74 より一部引用した)

### 4.3.5. 培養細胞における細胞膜およびミトコンドリア K<sub>ATP</sub> チャンネル

#### 阻害薬による、NMDA 誘発性神経細胞障害に対する影響

マウス初代大脳皮質神経細胞における、NMDA 誘発性興奮性神経毒性に対する影響を MTT 還元能を測定することによって評価した (Fig.25)。その結果、NMDA 処置は無処置群と比較して、MTT 還元能を約 30%程度に有意に減少させた。一方で、この作用をミノキシジルの前処置によって、おおよそ 70%程度まで有意に回復させた。しかしながら、細胞膜上選択的阻害薬である 100 μM HMR1098 およびミトコンドリア内膜上の mK<sub>ATP</sub> チャンネル選択的阻害薬である 500 μM 5-hydroxy decanoic acid (5-HD)はミノキシジルの作用を反転させることが期待されたが、ばらつきが大きく、変化を特定できなかった。

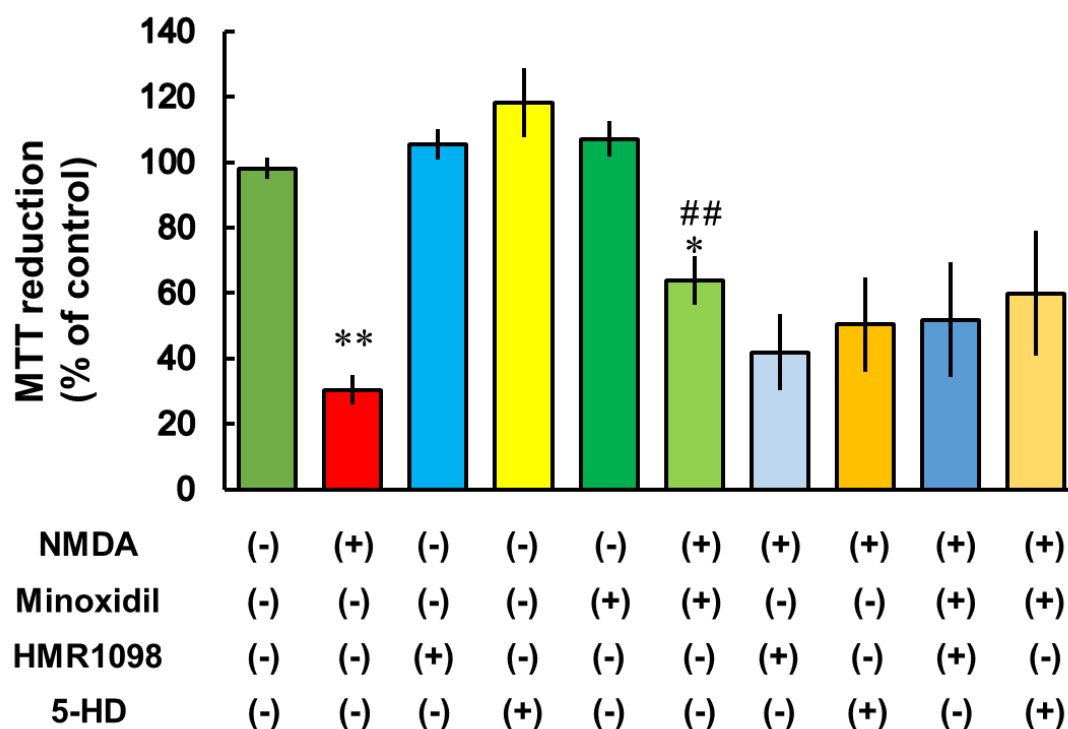


Fig.25. K<sub>ATP</sub> チャンネル選択的阻害薬によるミノキシジルによる神経保護作用に対する効果

培養 8 日目の大脳皮質神経細胞に細胞膜 K<sub>ATP</sub> チャンネル阻害薬 HMR1098、ミトコンドリア K<sub>ATP</sub> チャンネル阻害薬 5-HD を 10 分間前処置した。その後ミノキシジルを 5 分間処置した。2 分間 NMDA 曝露し、新鮮な培地に置き換え 24 時間後、神経細胞生存率を MTT 還元能により定量した。\*\**p* < 0.01 vs. vehicle, #*p* < 0.05 vs. NMDA (Bonferroni's test).

## 考察

ミノキシジルは NMDA 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を変化させなかった (Fig.21) が、そもそもミノキシジルは NMDA 受容体を遮断しないことに起因する。NMDA 曝露に伴う培養神経細胞の MTT 還元能低下をミノキシジルは有意に抑制したものの、完全には抑制できなかった。以上のことと、AIF の核内移行を抑制しなかったこと (第 2 章、Fig.16) から、NMDA 誘発性神経細胞死は、ミトコンドリア由来によるアポトーシスだけでなく、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 流入に伴うカルパイン等の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質の活性化を介して引き起こされたことが示唆された。

MCAO 実験ではグリベンクラミドがミノキシジルの神経保護作用を抑制した (Fig.22)。糖尿病では、血液の高血糖状態が続くと血管が脆くなり様々な末梢血管障害を引き起こす (59)。脳梗塞の糖尿病性末梢血管障害の原因となる (60)。したがって、血糖値を管理することは脳血管疾患に対する有効な治療戦略であるが、グリベンクラミドのようなスルホニル尿素 (SU) 薬はその他糖尿病治療薬と比較して脳血管疾患発症リスクが高いとされる (40,41)。本研究結果はこの報告を裏付けたことになる。

グリベンクラミドは細胞膜上のミノキシジルに起因する  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの開口頻度を減少させることを示した。加えて細胞内  $\text{K}^{+}$ レベルはグリベンクラミドがミノキシジル誘導性  $\text{K}^{+}$ 減少の程度を有意に減弱させることを示した。したがって、グリベンクラミドによるミノキシジル誘導性抗興奮性神経毒性作用は細胞内  $\text{K}^{+}$ レベルを増大させることに基づくことが示唆された (Fig.23)。一方、培養神経細胞ではグリベンクラミドは細胞膜の脱分極を引き起こしてしまうため、前処置しにくい事が判明した。膵 B 細胞へのグリベンクラミド処置は  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルを遮断して、細胞内  $\text{K}^{+}$ 濃度を増加させることにより細胞膜を脱分極させ、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 開口に伴う  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を起こす。この  $\text{Ca}^{2+}$ 流入がインスリン分泌の引き金となる (60)。神経細胞の場合、脱分極は活動電位を発生させるため、電位依存性  $\text{K}^{+}$ チャネル開口に伴う細胞内  $\text{K}^{+}$ レベル変動させるため、その後、ミノキシジル曝露に伴う細胞内  $\text{K}^{+}$ 濃度の変動は測定しにくい可能性がある。事実、APG の蛍光強度はグリベンクラミド単独曝露ではばらつきが大きく、期待された増加がみられなかった (Fig.24C)。一方で、ミノキシジル前処置がグリベンクラミドの作用を抑制する結果は得られた (Fig.24A, B)。このことから、ミノキシジルの作用が  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル作動を介した減少であることが裏付けられた。

$\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルは細胞膜のみならず、ミトコンドリアに対しても発現している (60)。細胞膜およびミトコンドリア膜のいずれにおいても発現する  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルは細胞質基質の  $\text{K}^{+}$ レベルを減少させるように働く (61)。しかしながら、細胞膜  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルは細胞外に流出させるが、ミトコンドリアの  $\text{mK}_{\text{ATP}}$  チャネルはミトコンドリアマトリックスに  $\text{K}^{+}$ を流入させることでミトコンドリア膜電位を脱分極させるところが異なる。これらを遮断することは、

いずれも細胞質基質の  $K^+$ 濃度を増加させ、PTP 開口に伴うミトコンドリア脱分極の程度を増加させることが考えられる。しかしながら、細胞膜  $K_{ATP}$  チャンネル選択的阻害薬 HMR1098 や  $mK_{ATP}$  チャンネル選択的阻害薬 5-HD、いずれの選択的  $K_{ATP}$  阻害薬条件でもばらつきが多く、ミノキシジルの効果と比較できるような結果は得られなかった。一つの可能性として、これらの阻害薬は、グリベンクラミドと同様に、神経細胞を脱分極させてしまうからかも知れない。なお、第2章の結果からミノキシジルは  $DiSC_3(5)$  蛍光強度を変化させなかったことを示した。したがって、少なくとも本実験系においては、ミノキシジルはミトコンドリアに対して作用していないものと考えている。



## おわりに

生体内における  $K^+$  は細胞外よりも細胞内に高濃度に貯蔵されている。イカ神経軸索内や筋細胞内における  $K^+$  レベルは、それぞれ、400 mM と 155 mM であり、筋細胞外濃度は 4 mM である (62, 63)。この濃度の違いは静止膜電位の形成に寄与している。高  $K^+$  血症や低  $K^+$  血症は心筋や骨格筋の機能異常を呈する (64-67)。一方で、神経細胞内の  $K^+$  レベル変動は、神経系の機能異常を起こすが、あまり重要視されない。これは、筋組織の機能異常の方が、神経系に対する影響よりも表現型として確認されやすく且つ重篤だからである。とはいえ、わずかな  $K^+$  レベルの変動が長期的に続いたらどうであろうか。神経系への影響、例えば興奮性の神経細胞死への影響は長期的な  $K^+$  レベルの変動により引き起こされるのではないだろうか。本研究の結果から、神経細胞内  $K^+$  レベルをより低くすることが出来、なおかつ筋組織に影響を与えないような化合物は、長期的に見て、神経保護作用が期待できる薬物になるかもしれない。

食事による  $K^+$  の過量もしくは過小摂取は長期間の摂取を除いてほとんどが健康に影響を与えない (68)。それほど、我々の身体は  $K^+$  に対する緩衝作用が強い。深刻な低  $K^+$  血症は利尿薬の服用もしくは重度の嘔吐、下痢に伴って引き起こされる (69-71)。逆に、高  $K^+$  血症のいくつかの要因は腎臓機能障害による排尿障害による (72)。臨床的な高  $K^+$  状態は腎不全によって引き起こされるため、一日摂取基準が設定されている。通常の食事週間や年齢に伴う腎機能低下は若年層と比較して高齢者は  $K^+$  濃度が高くなる傾向がある。興奮性細胞の周囲の  $K^+$  濃度の一過性上昇は、過分極を引き起こす (73)。細胞周囲の  $K^+$  濃度の上昇は、細胞内  $K^+$  レベルの上昇を引き起こし、静止膜電位を深めるだけでなく、PTP 開口に伴うミトコンドリア脱分極の程度もまた上昇させる。細胞周囲の  $K^+$  濃度の増加は神経脆弱性形成に関わっていることが示唆される。したがって、慢性的に全身の  $K^+$  レベルが上昇することは、神経細胞内の  $K^+$  レベルを上昇させ、神経変性疾患の発生を引き起こす可能性がある。

神経変性疾患を根治させるような治療法は未だ確立されていない。したがって変性や脱落は避けられず、かわりに神経細胞の再生に対する研究が盛んに行われている。しかしながら、再生医療では破綻した脳機能を補うため、外部からの iPS 細胞等の幹細胞を導入する必要がある。一方、本研究では神経細胞内  $K^+$  濃度を低下させることにより、既存の神経細胞をより長く生存させることに焦点を当てた。この方法なら若い頃からの生活習慣で神経変性を予防可能である。臨床的な応用を考える上で、再生医療では外科的手術を要するのに対して、細胞内  $K^+$  レベル調節は、これを要しない。加えて、神経細胞の脱落そのものを抑制することは、介護者や看護者に対する負担を軽減するだけでなく、費用に関しても軽減されるため、社会的意義が非常に大きいと考えられる。

本研究から、神経細胞内の  $K^+$  レベルが、興奮性神経毒性に対する神経細胞の脆弱性を決定する一因となることを明らかにできた (Fig.26)。細胞内の  $K^+$  レベルは様々な輸送タンパク質で調節されているが、高齢者や神経変性疾患患者の神経細胞では、これら輸送バランスが変化することで、神経細胞内  $K^+$  レベルが上がっているかもしれない。一方で、単純に体内  $K^+$  量を減少させてしまうと、心機能、骨格筋に対しての異常が認められる。つまり生命活動に関わる甚大な副作用が現れる可能性がある。したがって、中枢神経系に特異的に局在するタンパク質、例えば GPCR や大コンダクタンス型  $Ca^{2+}$  活性型  $K^+$  チャンネルを標的として  $K^+$  レベルを下げる事が出来れば、神経細胞だけに作用し、副作用の少ない治療薬となるかもしれない。高齢者人口数の増加に伴い、神経変性疾患の罹患数も増加することが見込まれる。神経変性疾患の発症そのものを抑止することは、我が国の持続的な発展を支えることに繋がる。したがって神経変性疾患に対する治療薬もしくは発症そのものを抑制する薬物の開発は社会的意義が大きく、本研究の推進はこれに貢献できると考えられる。

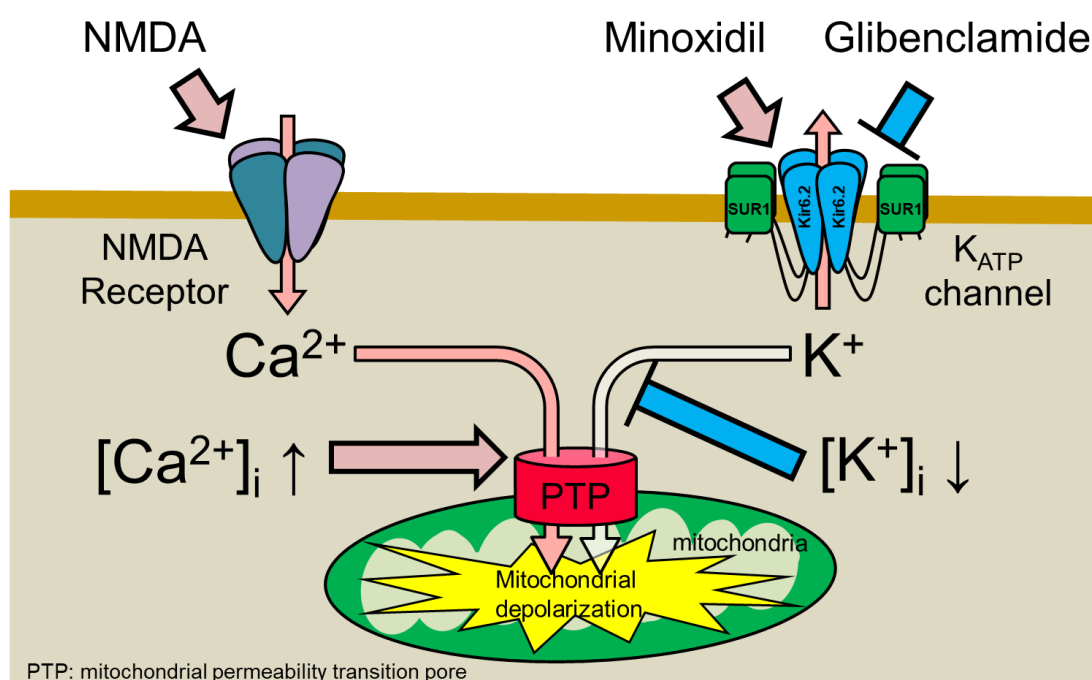


Fig.26. 細胞内  $K^+$  レベル変動と神経細胞脆弱性の関係性

## 結語

1. ミノキシジルは、MCAO（1時間）処置に続く再灌流 24 時間後のマウス脳内の神経組織傷害を抑制する。
2. ミノキシジルのマウス脳内の神経組織傷害抑制作用は、ミノキシジルの血圧低下作用と無関係である。
3. ミノキシジルは、培養神経細胞における NMDA 誘発性ミトコンドリア脱分極、アポトーシスの指標となるシグナル分子の活性化、神経細胞死を抑制する。
4. ミノキシジルのマウス脳内の神経組織傷害抑制作用及び培養神経細胞傷害抑制作用は、グリベンクラミドの前処置により抑制される。
5. 神経細胞特異的に  $K^+$ 濃度レベルを低下させる薬物は、神経変性疾患の発症予防と進行抑制に貢献しうる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、摂南大学薬学部機能形態学研究室 倉本展行准教授から多大なご指導・ご助言を賜りました。厚く感謝申し上げます。また、摂南大学薬学部機能形態学研究室 宇野恭介講師、金城俊彦助教から貴重なご助言を頂戴致しました。感謝申し上げます。研究遂行にあたり共に研究に携わり、有益なご討論、ご助言を戴いた摂南大学薬学部機能形態学研究室 大塩美知子学士、新宅美紀学士、吉村愛理学士、本田有紀さん、山本愛生さん、林亮佑君に感謝致します。

## 引用文献

1. Hata, J. Ninomiya, T. Hirakawa, Y. Nagata, M. Mukai, N. Gotoh, S. Fukuhara, M. Ikeda, F. Shikata, K. Yoshida, D. Yonemoto, K. Kamouchi, M. Kitazono, T. Kiyohara, Y. 2013. Secular trends in cardiovascular disease and its risk factors in Japanese: half-century data from the Hisayama Study (1961-2009). *Circulation* **128(11)**, 1198-1205
2. Baba, Y. Ishikawa, S. Kayaba, K. Gotoh, T. Kajii, E. 2011. High pulse pressure is associated with increased risk of stroke in Japanese: the JMS Cohort Study. *Blood Press.* **20(1)**, 10-14.
3. Inoue, R. Ohkubo, T. Kikuya, M. Metoki, H. Asayama, K. Kanno, A. Obara, T. Hirose, T. Hara, A. Hoshi, H. Totsune, K. Satoh, H. Kondo, Y. Imai, Y. 2009. Stroke risk of blood pressure indices determined by home blood pressure measurement: the Ohasama study. *Stroke.* **40(8)**, 2859-2861.
4. Kokubo, Y. Okamura, T. Watanabe, M. Higashiyama, A. Ono, Y. Miyamoto, Y. Furukawa, Y. Kamide, K. Kawanishi, K. Okayama, A. Yoshimasa, Y. 2010. The combined impact of blood pressure category and glucose abnormality on the incidence of cardiovascular diseases in a Japanese urban cohort: the Suita Study. *Hypertens Res.* **33(12)**, 1238-1243.
5. Konno, S. Munakata, M. 2015. Moderately increased albuminuria is an independent risk factor of cardiovascular events in the general Japanese population under 75 years of age: the Watari study. *PLoS One.* **10(4)**, e0123893.
6. Nakayama, T. Date, C. Yokoyama, T. Yoshiike, N. Yamaguchi, M. Tanaka, H. 1997. A 15.5-year follow-up study of stroke in a Japanese provincial city. The Shibata Study. *Stroke.* **28(1)**, 45-52.
7. Ohsawa, M. Tanno, K. Itai, K. Turin, TC. Okamura, T. Ogawa, A. Ogasawara, K. Fujioka, T. Onoda, T. Yoshida, Y. Omama, S. Ishibashi, Y. Nakamura, M. Makita, S. Tanaka, F. Kuribayashi, T. Koyama, T. Sakata, K. Okayama, A. 2013. Comparison of predictability of future cardiovascular events between chronic kidney disease (CKD) stage based on CKD epidemiology collaboration equation and that based on modification of diet in renal disease equation in the Japanese general population--Iwate KENCO Study. *Circ J.* **77(5)**, 1315-1325.
8. Takarada, T. Kou, M. Hida, M. Fukumori, R. Nakamura, S. Kutsukake, T. Kuramoto, N. Hinoi, E. Yoneda, Y. 2016. Protective upregulation of activating transcription factor-3 against glutamate neurotoxicity in neuronal cells under ischemia. *J Neurosci Res.* **94(5)**, 378-388.
9. Murakami, K. Kondo, T. Kawase, M. Li, Y. Sato, S. Chen, SF. Chan, PH. 1998. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci.* **18(1)**, 205-213.

10. Fujiwara, N. Som, A.T. Pham, L.D. Lee, B.J. Mandeville, E.T. Lo, E.H. Arai, K. 2016. A free radical scavenger edaravone suppresses systemic inflammatory responses in a rat transient focal ischemia model. *Neurosci Lett.* **633**, 7-13.
11. Choi, D.W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* **7(2)**, 369-379.
12. Hatfield, R.H. Mendelow, A.D. Perry, R.H. Alvarez, L.M. Modha, P. 1991. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a marker for ischaemic changes in rat brain following permanent middle cerebral artery occlusion. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **17(1)**, 61-67.
13. Hardingham, G.E. Bading, H. 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* **26(2)**, 81-89.
14. Rojas, A. Dingledine, R. 2013. Ionotropic glutamate receptors: regulation by G-protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol.* **83**, 746-752
15. Chittajallu, R. Wester, J.C. Craig, M.T. Barksdale, E. Yuan, X.Q. Akgül, G. Fang, C. Collins, D. Hunt, S. Pelkey, K.A. McBain, C.J. 2017. Afferent specific role of NMDA receptors for the circuit integration of hippocampal neurogliaform cells. *Nat Commun.* **8(1)**, 152.
16. Malenka, R.C. Nicoll, R.A. 1993. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci.* **16(12)**, 521-527
17. Leist, M. Volbracht, C. Kühnle, S. Fava, E. Ferrando-May, E. Nicotera, P. 1997. Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide. *Mol Med.* **3(11)**, 750-764.
18. Ghavami, S. Shojaei, S. Yeganeh, B. Ande, S.R. Jangamreddy, J.R. Mehrpour, M. Christofferson, J. Chaabane, W. Moghadam, A.R. Kashani, H.H. Hashemi, M. Owji, A.A. Łos, M.J. 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* **112**, 24-49.
19. Marchetti, P. Castedo, M. Susin, S.A. Zamzami, N. Hirsch, T. Macho, A. Haeflner, A. Hirsch, F. Geuskens, M. Kroemer, G. 1996. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med.* **184(3)**, 1155-1160.
20. Li, P. Nijhawan, D. Budihardjo, I. Srinivasula, S.M. Ahmad, M. Alnemri, E.S. Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* **91(4)**, 479-489.
21. Sen, N. Das, B.B. Ganguly, A. Mukherjee, T. Tripathi, G. Bandyopadhyay, S. Rakshit, S. Sen, T. Majumder, H.K. 2004. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate leishmania donovani. *Cell Death and Differentiation.* **11**, 924-936.
22. Cregan, S.P. Dawson, V.L. Slack, R.S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* **23(16)**, 2785-2796

23. Nedergaard, J. Ricquier, D. Kozak, L.P. 2005. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep.* **6(10)**, 917-921.
24. Schinder, A.F. Olson, E.C. Spitzer, N.C. Montal, M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* **16(19)**, 6125-6133.
25. Higashi, H. Ashida, Y. Taniguchi, T. Yamada, K. Ogita, K. Kinjo, T. Kuramoto, N. 2017. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity is largely unrelated to proliferation of P19 embryonic stem cells. *Glob Drugs Therap.* **Volume 2(5)**, 2-8.
26. Kinjo, T. Ashida, Y. Higashi, H. Sugimura, S. Washida, M. Niihara, H. Ogita, K. Yoneda, Y. Kuramoto, N. 2018. Alleviation by GABAB Receptors of Neurotoxicity Mediated by Mitochondrial Permeability Transition Pore in Cultured Murine Cortical Neurons Exposed to N-Methyl-D-aspartate. *Neurochem Res.* **43(1)**, 79-88.
27. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019-.2019 Jan 21. Pirahanchi Y and Aeddula NR.
28. Greenwood, I.A. Weston, A.H. 1993. Effects of rubidium on responses to potassium channel openers in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.* **109(4)**, 925-932.
29. Yokoshiki, H. Sunagawa, M. Seki, T. Sperelakis, N. 1998 ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* **274(1 Pt 1)**, C25-37.
30. Tsoporis, J. Fields, N. Lee, R.M. Leenen, F.H. 1993. Effects of the arterial vasodilator minoxidil on cardiovascular structure and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* **11(12)**, 1337-1345.
31. Lachgar, S. Charveron, M. Gall, Y. Bonafe, J.L. 1998. Minoxidil upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in human hair dermal papilla cells. *Br J Dermatol.* **138(3)**, 407-411.
32. 今井 明、鈴木ひろみ、渡辺 晃紀、梅山 典子、塚田 三夫、中村 勤、松崎 圭一、加藤開一郎、富保 和宏、2010、脳卒中患者の生命予後と死因の5年間にわたる観察研究：栃木県の調査結果とアメリカの報告との比較、*脳卒中*、**32**：572-578
33. Markgraf, C.G., Green, E.J., Hurwitz, B.E., Morikawa, E., Dietrich, W.D., McCabe, P.M., Ginsberg, M.D., Schneiderman, N. 1992. Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* **575(2)**, 238-246.
34. Yonemori, F., Yamada, H., Yamaguchi, T., Uemura, A., Tamura, A. 1996. Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* **16(5)**, 973-980.
35. Yonemori, F., Yamaguchi, T., Yamada, H., Tamura, A. 1999. Spatial cognitive performance after chronic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* **19(5)**, 483-494.
36. Tucker, A.B., Stocker, S.D. 2016. Hypernatremia-induced vasopressin secretion is not altered in TRPV1<sup>-/-</sup> rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **311(3)**:R451-456.

37. Spescha, R.D. Klohs, J. Semerano, A. Giacalone, G. Derungs, R.S. Reiner, M.F. Rodriguez, Gutierrez, D. Mendez-Carmona, N. Glanzmann, M. Savarese, G. Kränkel, N. Akhmedov, A. Keller, S. Mocharla, P. Kaufmann, M.R. Wenger, R.H. Vogel, J. Kulic, L. Nitsch, R.M. Beer, J.H. Peruzzotti-Jametti, L. Sessa, M. Lüscher, T.F. Camici, G.G. 2015. Post-ischaemic silencing of p66Shc reduces ischaemia/reperfusion brain injury and its expression correlates to clinical outcome in stroke. *Eur Heart J.* 36(25), 1590-1600.
38. Szydlowska, K. Tymianski, M. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* **47(2)**, 122-129.
39. Griffith, C.M. Xie, M.X. Qiu, W.Y. Sharp, A.A. Ma, C. Pan, A. Yan, X.X. Patrylo, P.R. 2016. Aberrant expression of the pore-forming KATP channel subunit Kir6.2 in hippocampal reactive astrocytes in the 3xTg-AD mouse model and human Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 336:81-101.
40. Parkinson, F.E., Hatch, G.M., 2016. Is there enhanced risk of cerebral ischemic stroke by sulfonylureas in type 2 diabetes? *Diabetes* **65 (9)**, 2479–2481.
41. Liu, R., Wang, H., Xu, B., Chen, W., Turlova, E., Dong, N., Sun, C.L., Lu, Y., Fu, H., Shi, R., Barszczyk, A., Yang, D., Jin, T., Mannucci, E., Feng, Z.P., Sun, H.S., 2016. Cerebrovascular safety of sulfonylureas: the role of KATP channels in neuroprotection and the risk of stroke in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **65 (9)**, 2795–2809.
42. Kuramoto, N., Baba, K., Gion, K., Sugiyama, C., Taniura, H., Yoneda, Y., 2003. Xenobiotic response element binding enriched in both nuclear and microsomal fractions of rat cerebellum. *J. Neurochem.* **85 (1)**, 264–273.
43. Takano, M., Xie, L.H., Otani, H., Horie, M., 1998. Cytoplasmic terminus domains of Kir6.x confer different nucleotide-dependent gating on the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J. Physiol.* **512 (Pt 2)**, 395–406.
44. Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C., Kroemer, G. 2004. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* **11(6)**, 591-595.
45. Perocchi, F. Gohil, V.M. Girgis, H.S. Bao, X.R. McCombs, J.E. Palmer, A.E. Mootha, V.K. 2010. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature.* **467(7313)**, 291-296.
46. Giorgio, V., Burchell, V., Schiavone, M., Bassot, C., Minervini, G., Petronilli, V., Argenton, F., Forte, M., Tosatto, S., Lippe, G., Bernardi, P., 2017. Ca<sup>2+</sup> binding to F-ATP synthase  $\beta$  subunit triggers the mitochondrial permeability transition. *EMBO Rep.* **18(7)**, 1065-1076.
47. Kinnally, K.W. Antonsson, B. 2007. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis.* **12(5)**, 857-868.
48. Laskowski, M. Augustynek, B. Kulawiak, B. Koprowski, P. Bednarczyk, P. Jarmuszkiewicz, W. Szewczyk, A. 2016. What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim*



- Biophys Acta*. **1857(8)**, 1247-1257.
49. Kawahito, S. Kawano, T. Kitahata, H. Oto, J. Takahashi, A. Takaishi, K. Harada, N. Nakagawa, T. Kinoshita, H. Azma, T. Nakaya, Y. Oshita, S. 2011. Molecular mechanisms of the inhibitory effects of clonidine on vascular adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesth Analg*. **113(6)**, 1374-1380.
  50. Li, Y. Ba, M. Du, Y. Xia, C. Tan, S. Ng, K.P. Ma, G. 2019. A $\beta$ 1-42 increases the expression of neural KATP subunits Kir6.2/SUR1 via the NF- $\kappa$ B, p38 MAPK and PKC signal pathways in rat primary cholinergic neurons. *Hum Exp Toxicol*. **38(6)**, 665-674.
  51. Suzuki, M. Kotake, K. Fujikura, K. Inagaki, N. Suzuki, T. Gonoi, T. Seino, S. Takata, K. 1997. Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. **241(3)**, 693-697.
  52. Riess, M.L. Camara, A.K. Heinen, A. Eells, J.T. Henry, M.M. Stowe, D.F. 2008. KATP channel openers have opposite effects on mitochondrial respiration under different energetic conditions. *J Cardiovasc Pharmacol*. **51(5)**, 483-491.
  53. Li, S.S. Cui, N. Yang, Y. Trower, T.C. Wei, Y.M. Wu, Y. Zhang, S. Jin, X. Jiang, C. 2015. Impairment of the Vascular KATP Channel Imposes Fatal Susceptibility to Experimental Diabetes Due to Multi-Organ Injuries. *J Cell Physiol*. **230(12)**, 2915-2926.
  54. Mundt, H.M. Matenaer, M. Lammert, A. Göttmann, U. Krämer, B.K. Birck, R. Benck, U. 2016. Minoxidil for Treatment of Resistant Hypertension in Chronic Kidney Disease--A Retrospective Cohort Analysis. *J Clin Hypertens*. **18(11)**, 1162-1167.
  55. Nakamura, M. Hiromori, K. 1995. Nitric Oxide and Cardiovascular Disease. *J Jan Soc Intensive Care Med*. **3**, 73-79.
  56. Martin, G.M. Yoshioka, C. Rex, E.A. Fay, J.F. Xie, Q. Whorton, M.R. Chen, J.Z. Shyng, S.L. 2017. Cryo-EM structure of the ATP-sensitive potassium channel illuminates mechanisms of assembly and gating. *Elife*. e24149.
  57. Na, J.S. Hong, C. Kim, M.W. Park, C.G. Kang, H.G. Wu, M.J. Jiao, H.Y. Choi, S. Jun, J.Y. 2017. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels maintain resting membrane potential in interstitial cells of Cajal from the mouse colon. *Eur J Pharmacol*. **809**: 98-104.
  58. Busija, D.W. Gaspar, T. Domoki, F. Katakam, P.V. Bari, F. 2008. Mitochondrial-Mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: Mitochondrial targeted preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev*. **60(13-14)**, 1471-1477
  59. Li, P.A. He, Q.P. Yi-Bing, O. Hu, B.R. Siesjö, B.K. 2001. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase after transient cerebral ischemia in hyperglycemic rats. *Neurobiol Dis*. **8(1)**, 127-35.
  60. Liu, H. Ou, S. Xiao, X. Zhu, Y. Zhou, S. 2015. Diabetes Worsens Ischemia-Reperfusion Brain Injury in Rats Through GSK-3 $\beta$ . *Am J Med Sci*. **350(3)**, 204-211.

61. Lederer, W.J. Nichols, C.G. 1989. Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in isolated membrane patches. *J Physiol.* **419**, 193-211.
62. Schmidt, R.F. 1985 Fundamentals of Neurophysiology. Springer-Verlag. *New York Berlin Heidelberg.*
63. Kandel, E.R. Schwartz, J.H. Jessel, T.M. Siegelbaum, S.A. Hudspeth, A.J. 2013. *Principles of Neural Science. The McGraw-Hill Companies, Inc.*
64. Parham, W.A. Mehdirad, A.A. Biermann, K.M. Fredman, C.S. 2006. Hyperkalemia revisited. *Tex Heart Inst J.* **33(1)**, 40-47.
65. Spodick, D.H. 2008. Effects of severe hyperkalemia. *Am Heart Hosp J.* **6(1)**, 68.
66. Jurkat-Rott, K. Lerche, H. Lehmann-Horn, F. 2002. Skeletal muscle channelopathies. *J Neurol.* **249(11)**, 1493-1502.
67. Kang, S.Y. Kim, J.S. Choi, J.C. Kang, J.H. Lee, J.S. 2008. An unusual pathologic feature and phenotype associated with familial hyperkalemic periodic paralysis. *Eur J Neurol.* **15(6)**, e47-48.
68. Overview of Dietary Reference Intakes for Japanese (2015) II Energy and Nutrients Minerals (1) Macromenarals Potassium. Page 206-209.
69. Stokes, W. 1964. A New Effective Diuretic—Lasix. *Br Med J.* **2(5414)**, 910-4.
70. Dongilli, R. Crivellaro, C. Targa, F. Donazzan, G. Herrmann, M. 2016. A Rare Case of Hypokalemia and Hypomagnesemia. *Clin Chem.* **62(3)**, 430-440.
71. Unwin, R.J. Luft, F.C. Shirley, D.G. 2011. Pathophysiology and management of hypokalemia: a clinical perspective. *Nat Rev Nephrol.* **7(2)**, 75-84.
72. Fried, L. Kovesdy, C.P. Palmer, B.F. 2011. New options for the management of chronic hyperkalemia. *Kidney Int Suppl.* **7(3)**, 164-170.
73. Raiteri, L. Zappettini, S. Milanese, M. Fedele, E. Raiteri, M. Bonanno, G. 2007. Mechanisms of glutamate release elicited in rat cerebrocortical nerve endings by 'pathologically' elevated extraterminal K<sup>+</sup> concentrations. *J Neurochem.* **103(3)**, 952-961
74. Higashi, H., Kinjo, T., Uno, K., Kuramoto, N. 2019. Regulatory effects associated with changes in intracellular potassium level in susceptibility to mitochondrial depolarization and excitotoxicity. *Neurochem Int.* **133**, 104627.