

脳血管三次元構造解析によるうつ病の新たな創薬標的の探索

梶谷直人

熊本大学大学院 生命科学研究部 神経精神医学講座

【研究の背景】

これまでに申請者は、うつ病の病態や治療メカニズムにリゾホスファチジン酸(LPA)が関与する可能性を示している(Kajitani et al., 2016, Omori et al., 2021)。LPAは血管形成因子であることから、うつ病では脳血管系に障害がある可能性が考えられるが、これまで立体的な血管ネットワークを解析するのは困難であったため、脳血管構造に着目した研究は未だ行われていない。

【目 的】

本研究では、近年開発された脳透明化技術(Miyawaki et al., 2020)を用いて、うつ病モデルマウスにおける脳血管の立体構造を解析し、うつ病の新たな創薬標的の基盤となる病態変化を探索することを目的とする。

【方 法】

微小血管でも詰まることなく、血管から漏れ出さない蛍光架橋剤として、蛍光色素にデキストランとアクリルアミドとの重合に必要なGMAを付加した化合物(FITC-Dex-GMA)を有機合成した。麻酔したマウス左心室から4%PFAを灌流して固定を行った。続いて、FITC-Dex-GMA、アクリルアミド溶液を灌流した。灌流後、マウスを窒素下で37℃、3時間温めることで重合させ血管鑄造を行った。FITC-Dex-GMAで全脳血管が検出できているか確認を行うため、血管鑄造した脳から凍結切片を作成し、抗CD31抗体による蛍光免疫組織化学染色を行った。

血管鑄造した上記マウスから脳を取り出し、デオキシコール酸ナトリウム溶液で脱脂を行い、尿素を含む溶液で処理することで、膨張の少ない方法で脳を透明化した。透明化した脳を2mm幅にカットし、蛍光顕微鏡(キーエンス)でZスタック撮影を行った。予備的検討から透明化した組織2mmの深さは通常の蛍光顕微鏡で観察できることを確認した。撮影した画像は3D解析ソフトを用いて、血管を立体構築した。構築した立体から200 μ m $\times$ 200 μ m $\times$ 200 μ mの立方体を切り出し、血管の表面積や体積などを計算し血管の複雑さを定量化した。

次に、うつ病モデルマウスを用いて、血管三次元構造解析を行った。うつ病モデルマウスは成獣雄性マウスに、ストレスホルモンであるコルチコステロンを飲水ボトルに加え(35mg/L)、7週間自由飲水させることで作成した。モデルの妥当性はショ糖嗜好性の低下(=アンヘドニア様行動)、novelty suppressed feeding test (NSFT)による摂食時間の低下(不安様行動)といったうつ病様行動を指標にした。

【結 果】

正常マウスを血管鑄造し脳透明化処理を行ったブロックを撮影した画像から立体構築を試みたところ、 $X=0.75\mu$ m, $Y=0.75\mu$ m, $Z=2.5\mu$ mのボクセルサイズで微小血管レベルまで認識可能な血管の立体構築を作成できた。Z軸方向の解像度の検出限界を調べたところ、500 μ mまでの深度であれば、微小血管まで検出可能であることが分かった。抗CD31抗体による免疫染色によって、FITC陽性血管が全血管のどの程度を占めるか検討したところ、CD31陽性血管のほぼすべてが

FITC 陽性であることを確認できた(図 1)。

コルチコステロン慢性投与したマウスで行動実験を行ったところ、対照マウスと比べ、ショ糖嗜好性の有意な低下、NSFT による摂食時間の有意な低下を観察した。抗うつ薬(amitriptyline, 10mg/kg)を 3 週間連日投与することで、これらのうつ病様行動が改善されることを確認した。このうつ病モデルマウスを用いて血管鑄造を行い、大脳皮質の複数の部位で定量解析を行った(N=1-2)。

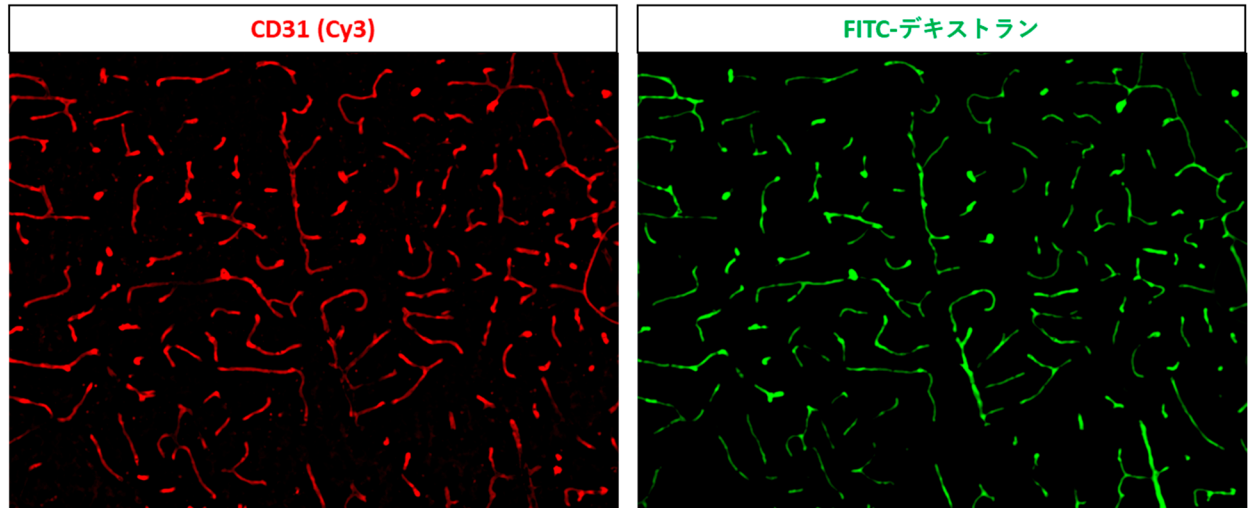


図1. 血管鑄造マウス大脳皮質切片をCD31で染色し、FITCとの一致率を検討

【考 察】

微小血管の三次元構造解析を行う実験系の確立は出来たが、実験系確立までに時間を要してしまい、うつ病モデルマウスでの微小血管構造変化については、N 数が少なく評価できなかった。今後追試を行い、うつ病様行動や治療効果発現に応じた微小血管構造の可塑的変化が生じる脳部位が存在するか網羅的に解析する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

うつ病の病態メカニズムは良く分かっていない。現在まで多くの研究者がうつ病の病態解明に取り組んでおり、それでも解明できていないことを考慮すると、これまでの実験手法では解明できない点にこそ、病態解明の糸口があるのではないかと考えている。本研究はこれまで取り組まれていない新たな微小血管三次元解析という方法で、うつ病の病態の理解に挑んだものであり、このような新たな取り組みの積み重ねが病態解明への一助となると思われる。

【参考・引用文献】

1. Kajitani N, Miyano K, Okada-Tsuchioka M, Abe H, Itagaki K, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Uezono Y, Takebayashi M. Identification of Lysophosphatidic Acid Receptor 1 in Astroglial Cells as a Target for Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Expression Induced by Antidepressants J Biol Chem. 2016 Dec 30;291(53):27364-27370.
2. Miyawaki T, Morikawa S, Susaki EA, Nakashima A, Takeuchi H, Yamaguchi S, Ueda HR, Ikegaya Y. Visualization and molecular characterization of whole-brain vascular networks with capillary resolution Nat Commun. 2020 Feb 27;11(1):1104.
3. Omori W, Kano K, Hattori K, Kajitani N, Tsuchioka MO, Boku S, Kunugi H, Aoki J, Takebayashi M. Reduced cerebrospinal fluid levels of lysophosphatidic acid docosahexaenoic acid (LPA-DHA) in patients with major depressive disorder and schizophrenia Int J Neuropsychopharmacol. 2021 Jul 2;pyab044.