

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09758

研究課題名(和文) バイオ3D プリンターを用いた脳アミロイド血管症モデルの作成と病態機序の解明

研究課題名(英文) Bio-fabrication of cerebral amyloid angiopathy model using Bio-3D printer and analysis of the pathophysiological mechanisms.

研究代表者

原 英夫 (Hara, Hideo)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00260381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳アミロイド血管症は血管壁に主としてA₄₀が蓄積し血管壁が脆弱となり、しばしば皮質の大出血を起こす。我々はバイオ3Dプリンターを用いた脳アミロイド血管症のモデル血管を作成し、脳アミロイド血管症が起こるメカニズムを解析した。A₄₀ペプチド存在下では、コラーゲン蛋白にA₄₀蛋白が沈着しておりouter layerのコラーゲン染色性の低下が見られ血管壁の脆弱性が示唆された。A₄₀ペプチドを添加したtube構造体としていない構造体では伸展の耐久値に差が見られた。張力測定後のtube構造体を内側面を上にして顕微鏡で観察した所A₄₀ペプチドを添加したtube構造体は大きな亀裂が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳アミロイド血管症は血管壁に主としてA₄₀が蓄積するため血管壁が脆弱となり、しばしば皮質の大出血を起こす。最近では脳アミロイド血管症関連の脳炎症状態も報告されているが、その機序は解明されていない。我々はバイオ3Dプリンターを用いた脳アミロイド血管症のモデル血管を作成し、脳アミロイド血管症が起こるメカニズムを解析し、さらに血管壁の破綻による大出血や血管周囲炎症を予防する治療法の開発を目的とした。この研究により血管壁へのA₄₀沈着を除去できる治療法の開発や血管壁にA₄₀沈着するメカニズムも解明し、予防的な治療法の開発にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is a small vessel disease by the deposition of amyloid protein (mainly Ab₄₀) in cortical vessels and results in vessel fragility and intracerebral hemorrhages. We established a scaffold-free system for assembling cell constructs using an automated Bio-3D printer. We aim to create an in vitro model of CAA using a bio-3D printer, and analyze the pathophysiology and mechanisms that causes CAA. Immunostaining against α-smooth muscle actin (α-SMA) showed the smooth muscle phenotype of cells in the inner layers in control, however, decreased SMA stainability in the presence of Ab₄₀. The tensile strength of the tubular vessels were tested with a cyclic tension test, applied with a tensometer, revealed decreased elasticity and strength in the presence of Ab₄₀. CAA in vitro model showed the different stainability of collagen, SMA and CD31, and decreased elasticity and strength of tubular vessels compared to control, suggesting vessel fragility.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：脳アミロイド血管症 バイオ3D プリンター スフェロイド A_{40/42} アミロイド前駆蛋白遺伝子

1. 研究開始当初の背景

現在、アルツハイマー病の病態で解明すべき点が多く残されている。脳アミロイド血管症 (Cerebral amyloid angiopathy: CAA) がその1つであり、脳アミロイド血管症は血管壁に主として $A\beta$ 40 が蓄積し血管壁が脆弱となり、正常血圧でも血管が破綻し、しばしば皮質下の大出血を起こす。

疑問点として $A\beta$ 40 蓄積が主で何故 $A\beta$ 42 は少ないのか、皮質出血が多く深部白質の出血は少ないのか等が挙げられる。また脳アミロイド血管症周囲での炎症状態の関与が示唆されている。 $A\beta$ の髄液から血管を介してのクリアランス機構が存在し、その破綻が脳アミロイド血管症の発症に関与している事が想定されクリアランス機構の解明も重要な課題である。

2. 研究の目的

脳アミロイド血管症は血管壁に主として $A\beta$ 40 が蓄積し血管壁が脆弱となり、しばしば皮質の大出血を起こす。最近では脳アミロイド血管症関連の脳炎症状態も報告されているが、その機序は解明されていない。我々はバイオ 3D プリンターを用いた脳アミロイド血管症のモデル血管を作成し、脳アミロイド血管症が起こるメカニズムを解析し、さらに血管壁の破綻による大出血や血管周囲炎症を予防する治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

我々は細胞凝集塊を積み上げることにより、任意の XYZ の位置に複数の細胞を配置することにも成功し、細胞だけで任意の形状の細胞構造体を作る手法(Bio Rapid prototyping system; 以下 BRP)を確立した。接着系細胞が有する基本的機能である細胞凝集現象により、細胞を低接着性の well に置いておくだけで細胞同士が融合し球体 (細胞凝集塊、スフェロイド) が形成される。任意の XYZ の位置に複数のスフェロイドを配置するロボットシステム“バイオ 3D プリンター”により 3次元デザインデータを基にスフェロイドを剣山に重ねていくことで、生きた細胞によるより複雑な立体構造を精密かつ簡便に作成することが可能となった。細いノズルで吸い上げたスフェロイド (直径 400-500 μ m) を 3D デザイン通りに移送し、剣山の針に刺して固定する。暫く培養するとスフェロイド同士が融合するので、融合後に剣山を引き抜くと scaffold free の立体構造が得られる。Bio Rapid prototyping system とバイオ 3D プリンターを用いて、脳アミロイド血管症のモデル血管を *in vitro* において作成した。

ヒト線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblast ; NHDF) と平滑筋細胞(Smooth Muscle Cell ;SMC)を用いてスフェロイドを作り $A\beta$ が細胞に付着するか実験を行った。

NHDF(40%)/SMC(60%)の比率でスフェロイドを融合させコンストラクトを形成し、これを各種濃度の $A\beta$ 40 を含む培養液に入れ 24 時間培養し細胞表面に付着した $A\beta$ を免疫染色で確認した。 $A\beta$ 40 の濃度の 0.25, 0.5 μ M では $A\beta$ の付着は観察できなかったが、1.0 μ M 濃度ではスフェロイド表面に $A\beta$ の付着を確認できた。次に、管腔構造を持つコンストラクトのチューブ型を作り $A\beta$ が細胞に付着するか実験を行った。NHDF(40%)/SMC(60%)のスフェロイドを剣山に挿入し細胞を融合させ管腔構造のチューブを作成した。一方、神経芽細胞株 SHSY-5Y に

アミロイド前駆蛋白遺伝子(APP)を安定発現させた細胞株を作成した(SHSY-APP)。この細胞株の培養上清中には A β 40 は 600.6pg/ml, A β 42 は 46.4pg/ml の濃度で含まれている。管腔構造のチューブを SHSY-APP の培養上清の中で 1~5 週間培養し細胞表面に付着した A β を免疫染色で確認した。

4. 研究の成果

ヒト線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblast ; NHDF) と平滑筋細胞(Smooth Muscle Cell ;SMC)を用いてスフェロイドを作り A β が細胞に付着するか実験を行った。

NHDF(40%)/SMC(60%)の比率でスフェロイドを融合させコンストラクトを形成し、これを各種濃度の A β 40 を含む培養液に入れ 24 時間培養し細胞表面に付着した A β を免疫染色で確認した。基底膜の主な構成蛋白はコラーゲン 4 なので tube 構造体をコラーゲン 4 免疫染色した。

血管中膜の Elastica van Gieson (EVG) 染色ではコントロールと比較して A β 40 ペプチド存在下では、outer layer のコラーゲン染色性の低下が見られ血管壁の脆弱性が示唆された。コントロールは血管壁の内側に SMC の反応が強く見られるが、A β 40 ペプチドが入っている血管は SMC の inner layer での染色性が低下している。CD31 免疫染色 (内皮細胞) の比較ではコントロールは inner layer に集中しているが、A β 40 ペプチドでは中膜、外膜にも CD31 の反応が見られる。基底膜の主な構成蛋白はコラーゲン 4 なので tube 構造体をコラーゲン 4 免疫染色したところ、A β 40 とコラーゲン 4 の染色が同じ部位に見られた。これによりコラーゲン蛋白に A β 蛋白が沈着している事が判明した。通常の血管には強度を保つためにエラスチンが発現し、心臓付近や動脈など血流の多い部分ではエラスチン多く見られる。A β 40 ペプチドや SHSY-APP を添加した tube 構造体には内側と一部の外側にエラスチンの反応が見られた。SMC には A β 40 の付着は見られなかった。血管壁の脆弱性について張力実験をおこなった。A β 40 ペプチドを添加した tube 構造体としていない構造体では耐久値に差が見られた。張力測定後の tube 構造体を内側面を上にして顕微鏡で観察した所 A β 40 ペプチドを添加した tube 構造体は大きな亀裂が確認できるが、添加していない tube 構造体では細かい亀裂が確認できた。このように A β 40 が沈着した血管 Tube 構造体の強度はコントロールと比較して低下していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 原英夫	4. 巻 95
2. 論文標題 アルツハイマー型認知症の病態修飾治療の今後	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床と研究	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉川正章、薬師寺祐介、原英夫	4. 巻 17
2. 論文標題 脳卒中専門医のための画像診断：Cortical superficial siderosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 分子脳血管病	6. 最初と最後の頁 71-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yakushiji Y, Charidimou A, Noguchi T, Nishihara M, Eriguchi M, Nanri Y, Kawaguchi A, Hirotsu T, Werring DJ, Hara H	4. 巻 57
2. 論文標題 Total small vessel disease score in neurologically healthy Japanese adults in the Kashima scan study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 189-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8393-16	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yakushiji Y, Wilson D, Ambler G, et al(10番目)	4. 巻 92
2. 論文標題 Distribution of cerebral microbleeds in the East and West.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1086-e1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/WNL0000000000007039	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴山耕平、薬師寺祐介、原英夫	4. 巻 4
2. 論文標題 Cerebral microbleeds例での一次予防・二次予防	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 脳梗塞と心房細動	6. 最初と最後の頁 9-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 原英夫	4. 巻 106
2. 論文標題 アルツハイマー型認知症の最新の治療とケア	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本内科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1991-1995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yakushiji Yusuke, Charidimou Andreas, Noguchi Tomoyuki, Nishihara Masashi, Eriguchi Makoto, Nanri Yusuke, Kawaguchi Atsushi, Hirotsu Tatsumi, Werring David J., Hara Hideo	4. 巻 57
2. 論文標題 Total Small Vessel Disease Score in Neurologically Healthy Japanese Adults in the Kashima Scan Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8393-16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上床希久、薬師寺祐介、井手俊宏、田畑絵美、吉川正章、原英夫	4. 巻 39
2. 論文標題 ダビガトランとアスピリン内服で内頸動脈可動性血栓が消失した非弁膜症性心房細動合併アテローム血栓性脳梗塞の1例	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 脳卒中	6. 最初と最後の頁 277-281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3995/jstroke.10448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eriguchi M, Yakushiji Y, Tanaka J, Nishihara M, Hara H.	4. 巻 56
2. 論文標題 Thrombolytic-related multiple lobar hemorrhaging in cerebral amyloid angiopathy with extensive strictly lobar cerebral microbleeding.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1907-1910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2169/internalmedicine.56.8007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永石友公子、薬師寺祐介、下田 良、増田正憲、原 英夫	4. 巻 39
2. 論文標題 ダビガトランからアピキサバンへの変更で、食道炎が速やかに改善した非弁膜症性心房細動患者の一例	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 脳卒中	6. 最初と最後の頁 304-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3995/jstroke.10459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 原英夫
2. 発表標題 学術教育講演；感染症と認知症
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴山耕平、薬師寺祐介、西原正志、江里口誠、野口智幸、田中淳、原英夫
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症と脳出血患者における髄液バイオマーカーの検討
3. 学会等名 第27回日本脳ドック学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 薬師寺祐介, 原めぐみ, 鈴山耕平, 西原正志, 江里口誠, 野口智幸, 西山雅則, 南里悠介, 田中淳, 原英夫
2. 発表標題 高血圧とライフスタイル関連因子の相乗効果とSmall Vessel Diseaseの関連 -the Kashima scan study -
3. 学会等名 第27回日本脳ドック学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川正章, 鈴山耕平, 薬師寺祐介, 原英夫
2. 発表標題 繰り返すTransient focal neurological episodeの発症後早期に皮質下出血を発症した脳アミロイドアンギオパチーの一例.
3. 学会等名 第223回 日本神経学会九州地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原英夫
2. 発表標題 アルツハイマー型認知症の最新の治療とケア
3. 学会等名 第114回日本内科学会講演会 教育講演(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原英夫
2. 発表標題 アルツハイマー型認知症など神経変性疾患に対する免疫療法
3. 学会等名 第29回日本神経免疫学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mizoguchi M, Yakushiji Y, Eriguchi M, Kosugi M, Sakamoto M, Horikawa E, Hara H.
2. 発表標題 Validation study for the Japanese version of the Informant Questionnaire on Cognitive Decline on the Elderly (IQCODE-J).
3. 学会等名 The 23rd World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yakushiji Y, Kawamoto K, Uchihashi K, Nagaishi Y, Suzuyama K, Tsugitomi Y, Aoki S, Hara H.
2. 発表標題 Low-dose Phosphodiesterase III inhibitor reduces the vascular amyloid burden in Amyloid- Protein Precursor Transgenic Mice.
3. 学会等名 European Stroke Organization Conference 2017. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 七條千佳, 薬師寺祐介, 吉岡史隆, 河島雅到, 相島慎一, 河本和裕, 原英夫
2. 発表標題 本邦におけるボストン基準による 脳アミロイドアンギオパチー関連脳出血の 診断制度の検討
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中淳, 薬師寺祐介, 江里口誠, 野口智幸, 原英夫
2. 発表標題 Total small vessel disease scoreと腎機能の関連: The Kashima Scan Study
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川正章, 薬師寺祐介, 野口智幸, 小杉雅史, 原英夫
2. 発表標題 無症候性脳出血性病変の頻度の検討: The Kashima Scan Study
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 薬師寺祐介, 田中淳, 野口智幸, 河島雅到, 井手俊宏, 永石友公子, 溝口恵, 原英夫
2. 発表標題 原発性脳アミロイドアンギオパチー関連脳出血の割合は東洋・西洋間で異なる
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 薬師寺祐介, 池田宗平, 吉川正章, 原英夫
2. 発表標題 教育講演: 無症候性脳梗塞と脳小血管病
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上床希久, 薬師寺祐介, 江里口誠, 河本和裕, 原英夫
2. 発表標題 ステロイド療法で認知機能と活動性アミロイド関連画像異常が改善した一例
3. 学会等名 第220回日本神経学会九州地方会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 原 英夫(分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2066
3. 書名 アルツハイマー病、今日の治療指針2018	

1. 著者名 原 英夫	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 362
3. 書名 認知症疾患診療ガイドライン2017	

1. 著者名 原 英夫	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2066
3. 書名 今日の治療指針2018, アルツハイマー病	

1. 著者名 原 英夫	4. 発行年 2017年
2. 出版社 ライフ・サイエンス	5. 総ページ数 133
3. 書名 認知症の予防	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

