

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07890

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・客員研究員

研究者番号：00260381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はバイオ3Dプリンターを用いて、ヒト由来の細胞から成る血管構造体を作成し、血液脳関門の構造・機能を持った脳アミロイド血管症モデルを作成した。線維芽細胞、臍帯静脈内皮細胞、アストロサイト、ペリサイト細胞を培養し、バイオ3Dプリンターを用いて、スフェロイドを剣山に積層しチューブ型に形成して還流培養を行い、7日後に構造体を剣山から外し、蛍光ラベルA<sub>40</sub>を添加した。蛍光免疫染色では、A<sub>40</sub>は大動脈平滑筋細胞内部やその周囲に多く見られた。大動脈平滑筋細胞・内皮細胞の構造は保たれていた。この血管状構造体を、張力計を用いて引張試験を行ったところA<sub>40</sub>投与により組織が硬化して弾力が失われていた。

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の病態機序や治療法は未だ解明されていない。この研究により脳アミロイド血管症のモデル血管をin vitroで作成することにより、血管壁のA<sub>40</sub>沈着を除去できる様々な治療法の開発に応用できると考えられる。また血管壁にA<sub>40</sub>沈着するメカニズムも解明できた場合には、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)：We established a scaffold-free system for assembling cell constructs using an automated Bio-3D printer with the Kenzan method. We aim to create an in vitro model of CAA using this method, and analyze the pathophysiology and mechanisms that causes CAA. We assemble multicellular spheroids composed of normal human dermal fibroblasts, smooth muscle cell and human umbilical vein endothelial cell to construct tubular vessels and cultured in the presence of Abeta 40 peptides. Immunostaining against Abeta 40 showed the amyloid deposition on the outer layer of vessel wall at the site that matches collagen IV positive extracellular matrix, but not coincident with SMA. The tensile strength of the tubular vessels revealed decreased elasticity and strength in the presence of Abeta 40. 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：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<sub>40/42</sub> アミロイド前駆蛋白遺伝子

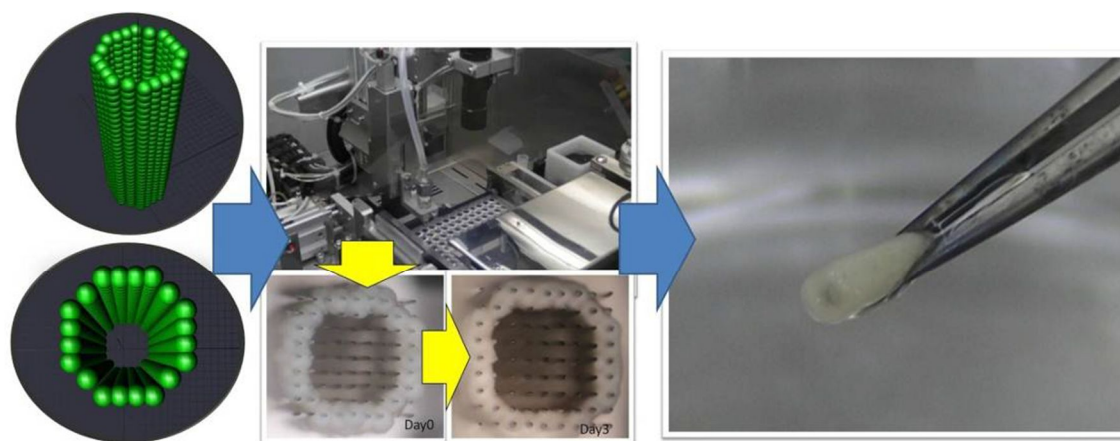
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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。最近では高齢者の頭部 MRI 検査で皮質下白質の T2 高信号が認められ、Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation として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。また高齢者の一部に急性または亜急性に認知機能低下、痙攣、頭痛や脳卒中様エピソードなどの症状が報告されている。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、しばしば大脳皮質での大出血を起こす。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。

### 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

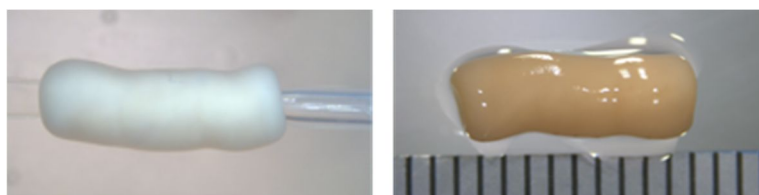
Bio Rapid prototyping system とバイオ 3D プリンターを用いて、脳アミロイド血管症のモデル血管を *in vitro* において作成する。

我々は細胞凝集塊を積み上げることにより、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。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。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<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> を免疫染色で確認した。次に、ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Huvec)も追加して管腔構造を持つコンストラクトのチューブ型を作り A<sub>β</sub> 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。

#### 4 . 研究成果

##### (1) ヒトの脳毛細血管を模した血管構造体の作成

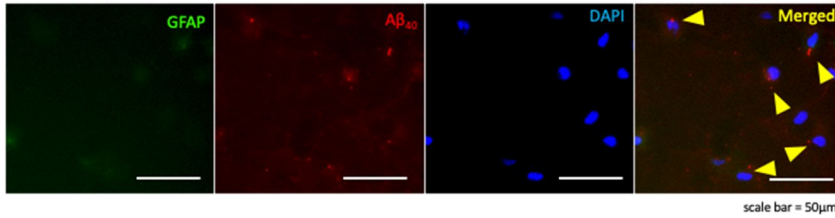
HUVEC: Astrocyte: Pericyte : NHDF=2 :3.5 :3.5 :1 の割合で細胞凝集塊 (スフェロイド) を作製し、バイオ 3D プリンターを用いて、剣山上にチューブ型に積層した。7 日間剣山上で還流培養し、PDMS チューブ上でさらに 2 週間還流培養を継続した。その後、構造体の両端をサーフローで支持するブリッジ形式で培養を継続した。



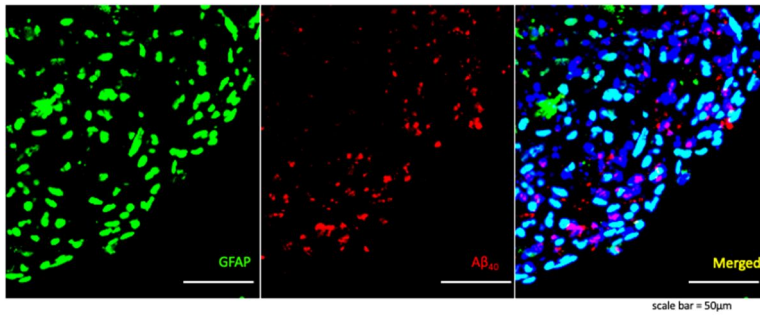
管状構造は保たれ、構造体表面のスフェロイドは滑らかに癒合した。血管状構造体を作製することが可能であった。

##### (2) 血管構造体へのアミロイド タンパクの投与実験

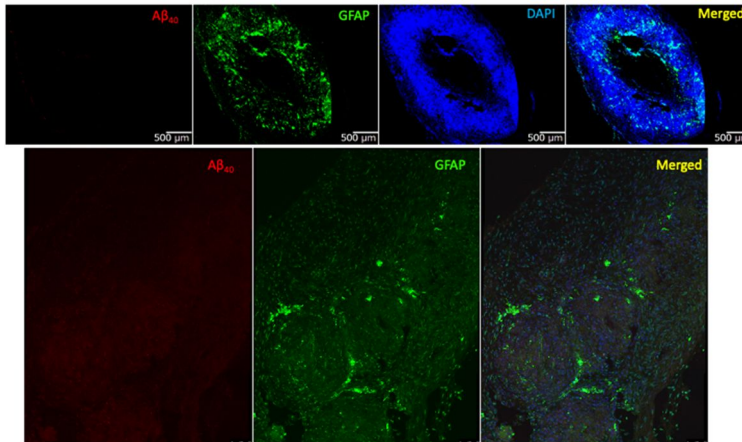
上記で作製した血管状構造体に A<sub>β</sub> 40 を投与すると、生体の脳内と類似した A<sub>β</sub> クリアランスが見られるかどうか検討した。この実験では、蛍光色素が結合した A<sub>β</sub> 40 (A<sub>β</sub> 40, HiLyte Fluor<sup>TM</sup>555-labeled) を使用した。アストロサイト細胞質内に A<sub>β</sub> 40 の貪食が見られた。



A<sub>40</sub> はスフェロイド表面に多く存在し、一部でアストロサイトへの貪食も認められた。

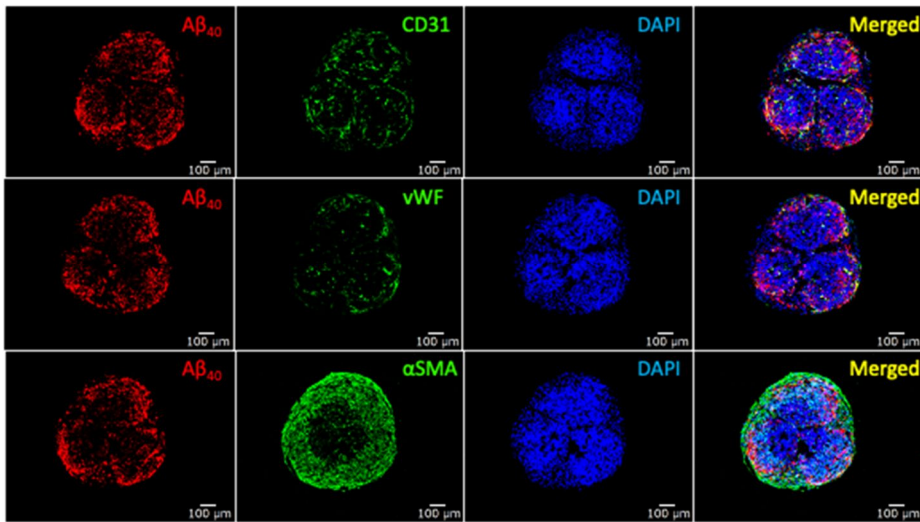


・アストロサイト：強拡大写真では、GFAP 陽性アストロサイトの A<sub>40</sub> 貪食を確認できた。



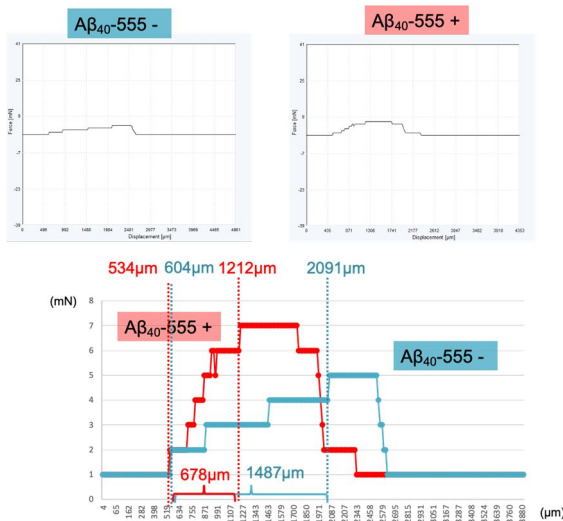
### (3) A は血管のどの部位に付着するか

生体内では、A が血管へ付着し、脳アミロイド血管症等の疾患の原因となる。動脈を模した血管構造体を作製し、A<sub>40</sub> を投与してその挙動を確認した。平滑筋（ $\alpha$ -SMA 陽性細胞）内に A<sub>40</sub> の共局在が確認できた。



#### (4) 血管状構造体

・引張試験：A 投与群は、組織の硬化が示唆された(displacement を測定すると、A 投与群は非投与群より 800 μm 伸長が少なかった)。



我々はバイオ 3D プリンターを用いて、ヒト由来の細胞から成る血管構造体を作成し、血液脳関門の構造・機能を持ったモデルを作成した。

この血管状構造体に A 40 を投与すると、平滑筋細胞内部や周辺の組織に沈着することが確認できた。これによりアミロイド血管症の状態に近いモデルを作成することが出来た。また、A 40 が沈着した血管状構造体は、組織が硬化し弾力が失われた。これは、生体での脳血管脆弱を再現している可能性があると考えられた。これまでの実験結果から、BBB の構造(内皮細胞タイトジャンクション形成)を模倣した血管状構造体の作製は可能であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 原英夫	4. 巻 98
2. 論文標題 認知症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床と研究	6. 最初と最後の頁 62-67
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 M Penova S Kawaguchi, J-i Yasunaga, T Kawaguchi, T Sato, M Takahashi, M Shimizu, M Saito, K Tsukasaki, M Nakagawa, N Takenouchi, H Hara, E Matsuura, S Nozuma, H Takashima, S Izumo, T Watanabe, K Uchimar, M Iwanaga, A Utsunomiya, Y Tabara, R Paul, Y Yamano, M Matsuoka, F Matsuda.	4. 巻 118
2. 論文標題 Genome-wide association study of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in the Japanese population.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 e2004199118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2004199118	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 該当する
1. 著者名 Mishima T, Fujioka S, Nishioka K, Li Y, ato K, Houzen H, IYabe I, Shiomi K, Makoto Eriguchi M, Hara H, Hattori N, Tsuboi Y	4. 巻 83
2. 論文標題 Meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Perry disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 49-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2020.12.017	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 Iritani O, Okuno T, Miwa T, Makizako H, Okutani F, Kashibayashi T, Kumiko S, Hara H, Mori E, Omoto S, Suzuki H, Shibata M, Adachi H, Kondo K, Umeda-Kameyama Y, Kodera K, Morimoto S	4. 巻 21
2. 論文標題 Olfactory-cognitive index distinguishes involvement of frontal-lobe shrinkage as in sarcopenia from shrinkage of medial temporal areas and global brain as in Kihon-Checklist frailty/dependence in older subjects with progression of normal cognition to Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 291-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.14128	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 Best JG, Ambler G, Wilson D, Lee K-L, et al. (97番目)	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of imaging-based risk scores for prediction of intracranial haemorrhage and ischaemic stroke in patients taking antithrombotic therapy after ischaemic stroke or transient ischaemic attack: a pooled analysis of individual patient data from cohort studies.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lancet Neurol.	6. 最初と最後の頁 294-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1474-4422(21)00024-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kumutpongpanich T, Ogasawara M, Ozaki A, et al. (36番目)	4. 巻 78
2. 論文標題 Clinicopathological features of oculopharyngo distal myopathy with LRP12 CGG repeat expansions; Compared with other oculopharyngodistal myopathy subtypes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JAMA Neurology	6. 最初と最後の頁 853-863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaneurol.2021.1509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 C Shichijo, K Kai, K Jinnouchi, M Nishihara, H Hara, S Aishima.	4. 巻 13
2. 論文標題 Intracranial Monckeberg's atherosclerosis is frequently found in autopsy cases of advanced stage malignancy with cerebral infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5234-5244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13205234	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 飯田紘太郎、薬師寺祐介、井手俊宏、鶴岡ななえ、七條千佳、原英夫	4. 巻 61
2. 論文標題 特発性好酸球増加症候群による非心原性多発穿通枝梗塞の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床神経	6. 最初と最後の頁 319-324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5692/clinicalneuro1.cn-001561	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 Suzuyama K, Yakushiji Y, Ogata A, Nishihara M, Eriguchi M, Kawaguchi A, Noguchi T, Nakajima J, Hara H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Total small vessel disease score and cerebro-cardiovascular events in healthy adults: The Kashima scan study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International J Stroke	6. 最初と最後の頁 973-979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1747493020908144	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 Takeuchi H, Imamura K, Ji B, Tsukita K, Enami T, Takao K, Miyakawa T, Hasegawa M, Sahara N, Iwata N, Inoue M, Hara H, Tabira T, Ono M, Trojanowski JQ, Lee V M-Y, Takahashi R, Suhara T, Higuchi M, Inoue H	4. 巻 5
2. 論文標題 Nasal vaccine delivery attenuates brain pathology and cognitive impairment in tauopathy model mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Vaccines	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41541-020-0172-y.	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 原英夫
2. 発表標題 第40回日本認知症学会学術集会 専門医試験対策講座 アルツハイマー病と症候学
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021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病態修飾薬の展望
3. 学会等名 第72回日本内科学会九州支部生涯教育講演会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Yoshikawa M, Yakushiji Y, Tanaka J, Ogata A, Nishihara M, Eriguchi M, Suzuyama K, Nagaishi Y, Mizoguchi M, Shichijo C, Ide T, Katsuki Y, Kawamoto K, Abe T, Hara H
2. 発表標題 Subclinical acute Ischemic lesions and cerebrospinal fluid profiles in intracerebral hemorrhage: HAGAKURE STUDY.
3. 学会等名 European stroke organisation - World stroke organization (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iida K, Yakushiji Y, Tanaka J, Nishihara M, Eriguchi M, Suzuyama K, Shichijo C, Nagaishi Y, Megumi M, Suetsugu N, Ide T, Yoshikawa M, Hoshino Y, Katsuki Y, Hideo H
2. 発表標題 Total Small Vessel Disease Score among Ischemic Stroke Subtypes: HAGAKURE study.
3. 学会等名 European stroke organisation - World stroke organization (ESO-WSO) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川正章、薬師寺祐介、緒方敦之、西原正志、小野翔平、井手俊宏、鈴山耕平、江里口誠、原英夫
2. 発表標題 脳アミロイドアンギオパチー関連脳出血臨床診断におけるBoston基準とEdinburgh基準の相違：HAGAKURE study
3. 学会等名 STROKE 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 薬師寺祐介、原英夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 10
3. 書名 認知症ハンドブック 第4章 認知症の危険因子と予防. 1 認知症と危険因子の関係. A. 高血圧と認知症の関係	

1. 著者名 薬師寺祐介、原英夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 13
3. 書名 脳卒中エキスパート：降圧療法を究める。	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中山 功一  (NAKAYAMA KOUITI)  (50420609)	佐賀大学・医学部・教授   (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------