

令和 5 年 3 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22675

研究課題名（和文）ラジカル含有ナノ粒子を併用した急性期脳損傷に対する再生医療

研究課題名（英文）Regenerative medicine for acute brain injury using radical-containing nanoparticles

研究代表者

高橋 利英（Takahashi, Toshihide）

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：50881562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：Embryonic Stem Cell（ES細胞）はE-Cadherinを介して移植細胞の成熟度を調節し、移植細胞の生着・増殖を促す可能性が指摘されている。逆にN-Cadherinは神経細胞の移動・遊走と成熟に重要な役割を果たし、これにより移植細胞の生着後に神経細胞の増殖を促すことができる可能性もある。まずは、間葉系細胞である歯髄幹細胞でE-Cadherin抗体およびN-Cadherin抗体を利用した細胞成熟コントロールの可能性を検証した。E-Cadherin群は低酸素状態では細胞への障害が少ない可能性が示唆された。N-Cadherin群は細胞の成熟促進効果の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の神経分化誘導方法では幹細胞の分化、増殖が進み、長期に未成熟状態を維持することが困難であるが、E-cadherinを介した幹細胞は未成熟を維持し増殖能も有することが報告されている。逆にN-Cadherinは神経細胞の移動・遊走と成熟に重要な役割を果たすことが報告されている。本研究において、ヒト歯髄幹細胞の培養においてもE-CadherinとN-Cadherinのこのような役割が示された。この結果は、細胞培養を行う今後の研究においても応用できるものであり意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It has been pointed out that Embryonic Stem Cells (ES cells) may regulate the maturation of transplanted cells through E-Cadherin, which may promote the engraftment and proliferation of transplanted cells. Conversely, N-Cadherin may play an important role in neuronal migration and maturation, which may promote neuronal proliferation after transplant cell engraftment. First, we tested the possibility of using E-Cadherin and N-Cadherin antibodies to control cell maturation in dental pulp stem cells, which are mesenchymal cells. The E-Cadherin group suggested that hypoxia may cause less damage to cells; the N-Cadherin group suggested the possibility of a cell maturation-promoting effect; and the N-Cadherin group suggested the possibility of a cell maturation-promoting effect.

研究分野：頭部外傷

キーワード：頭部外傷 再生医療 E-Cadherin N-Cadherin

## 1. 研究開始当初の背景

外傷性脳損傷後、神経細胞は自己修復能力を有するがその効果は不十分であるため、損傷された神経細胞に対しては移植細胞による再生医療の治療が期待されている(1)。しかし、外傷性脳損傷急性期は酸化ストレス、低酸素、炎症などの不利な環境のため、成熟神経細胞を移植しても生着率は低く、増殖能も低い(2)。酸素需要が低い未成熟神経細胞は低酸素環境で有利な可能性があるが、従来の神経分化誘導方法では分化、増殖が進み、長期に未成熟状態を維持することは難しい。Embryonic Stem Cell (ES細胞)はE-Cadherinを介して細胞の未成熟維持に寄与すると考えられており、これにより移植細胞の成熟度を調節し、移植細胞の生着・増殖を促すことができる可能性もある(3,4)。逆にN-Cadherinは神経細胞の移動・遊走と成熟に重要な役割を果たし、これにより移植細胞の生着後に神経細胞の増殖を促すことができる可能性もある(5,6)。

ヒト歯髄幹細胞 (Dental Pulp Stem Cell; DPSC) は神経堤に由来し、多能性で高い自己複製能と増殖能を有する。他の細胞と比較し、安定的かつ多量に神経系細胞を得られるため移植細胞として有用である(7)。

## 2. 研究の目的

間葉系細胞である歯髄幹細胞で、E-Cadherin抗体およびN-Cadherin抗体を利用した細胞成熟コントロールの可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

### 1

DPSCの培養方法を以下3群に分けてDPSCの成熟具合を評価した。成熟具合は軸索長にて評価し、免疫染色はGFAP(アストロサイト)、3tubulin(未成熟神経細胞)、MAP2(成熟神経細胞)を行なった。

Matrigel群: Matrigelコート(Thin Coating法)

Matrigelを無血性培地で8-12mg/mLで希釈  
dishにコーティング  
1時間インキュベーション(室温)  
無血性培地で洗浄

E-Cadherin群: E-Cadherin-Fcコート:

hE-Cadherin FcをPBS(-)で10µg/mLで希釈  
dishにコーティング  
24時間インキュベーション(4℃)  
PBS(-)で洗浄

hE-Cadherin Fc: ヒトE-CadherinマウスIgG Fcキメラ蛋白質

N-Cadherin群: N-Cadherin-Fcコート:

hE-Cadherin FcをPBS(-)で10µg/mLで希釈  
dishにコーティング  
24時間インキュベーション(4℃)  
PBS(-)で洗浄

hN-Cadherin Fc: ヒトN-CadherinマウスIgG Fcキメラ蛋白質

軸索長の評価方法:

各シャーレで培養した細胞を顕微鏡で撮影  
Image Jを用いて軸索長を測定  
ランダムに20細胞の軸索長を測定  
day1, day3, day7で平均値を結果とした

### 2

上記のMatrigel群とE-Cadherin群に対して酸素グルコース欠乏負荷(Oxygen-Glucose

deprivation; OGD) を実施して成熟具合を評価した。成熟具合は軸索長にて評価した。

Day 0 :

播種

37 °C、O<sub>2</sub> 21.0%、CO<sub>2</sub> 4.7%の環境下  
通常培地

Day 1 :

OGD 8 時間

37 °C、O<sub>2</sub> 1.0%、CO<sub>2</sub> 4.7%の環境下  
無糖培地

Day 2 以降 :

37 °C、O<sub>2</sub> 21.0%、CO<sub>2</sub> 4.7%の環境下  
通常培地

#### 4 . 研究成果

1

E-Cadherin 群は Matrigel 群と比較して、軸索長の伸長が抑制された。逆に、N-Cadherin 群は Matrigel 群と比較して、軸索長の伸長が促進された。

E-Cadherin 群は 3tubulin の発現は強く、MAP2 の発現は弱かった。逆に、N-Cadherin 群は 3tubulin の発現は弱く、MAP2 の発現は強かった。

2

E-Cadherin 群は Matrigel 群と比較して、軸索長の現象が緩やかであった。

結果のまとめ :

E-Cadherin 群は Matrigel 群と比較して未成熟な状態を維持することができ、低酸素状態では細胞への障害が少ない可能性が示唆された。

N-Cadherin 群は Matrigel 群と比較して、細胞の成熟促進効果の可能性が示唆された。

#### 【参考文献】

1. H.X. Tan, M.P. Del Borgo, M.I. Aguilar, J.S. Forsythe, J.M. Taylor, P.J. Crack. The use of bioactive matrices in regenerative therapies for traumatic brain injury. *Acta Biomater.* 2020;15(102):1-12.
2. E. Molina-Holgado, F. Molina-Holgado. Mending the broken brain: neuroimmune interactions in neurogenesis. *J Neurochem.* 2010;114:1277-1290.
3. Nagaoka M, Ise H, Akaike T. Immobilized E-cadherin model can enhance cell attachment and differentiation of primary hepatocytes but not proliferation. *M Biotech Lett.* 2002;24:1857-1862.
4. Yang S, Cao Z, Zhu J, Zhang Z, Zhao H, Zhao L, Sun X, Wang X. In vitro monolayer culture of dispersed neural stem cells on the E-cadherin-based substrate with long-term stemness maintenance. *ACS omega.* 2019;19(4):18136-18146.
5. Jinnou H. Regeneration using endogenous neural stem cells following neonatal brain injury. *Pediatric Int.* 2020. Doi:org/10.1111/ped.14368
6. Henriques D, Moreira R, Schwamborn J, L.P. Almeida, L.S. Mendonca. Successes and Hurdles in stem cells application and production for brain transplantation. *Front. Neurosci.* 2019. Doi:org/10.3389/fnins.2019.01194
7. Luo L, Wang X, Key B, B.H. Lee, Li H, Ye Q. Potential roles of dental pulp stem cells in neural regeneration and repair. *Stem Cells Int.* 2018. Doi:org/10.1155/2018/1731289

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|    |
|----|
| なし |
|----|

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|