



Title	歯髄幹細胞の脈管形成能におけるVE-cadherin の役割
Author(s)	佐々木, 淳一; 今里, 聰
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2022, 66(2), p. 5-8
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/93186
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

歯髄幹細胞の脈管形成能における VE-cadherin の役割

佐々木 淳一*, 今里 聰*

(令和4年3月10日受付)

はじめに

体内における血管形成の過程には、Angiogenesis（血管新生）と Vasculogenesis（脈管形成）の二種類がある。血管新生は、既存の血管が分枝を形成することで新規の血管が形成される事象を指し、脈管形成は、血管内皮前駆細胞から分化した血管内皮細胞が血管非存在下の領域に血管を形成することをいう。これまで、脈管形成は初期胚から循環系の発生段階のみで見られるプロセスと考えられていたが、近年、成人の血液中で血管内皮前駆細胞が発見され、脈管形成が発生期以降の血管形成においても作用していることが分かってきた。

ところで、歯髄幹細胞（DPSC）は外胚葉性間葉組織である神経堤由来の細胞であることから、象牙芽細胞や神経細胞などへの分化多能性を有していることが知られている¹⁾。近年、DPSC が血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の受容体を恒常に発現しており、VEGF を含む培地（分化培地）で培養すると血管内皮細胞に分化することが報告された²⁾。しかし、DPSC をはじめとした間葉系幹細胞由来の血管の機能化、すなわち脈管形成の詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。

一方、血管新生において、新たに形成された血管が血液を流す流路として機能するためのメカニズムは古くから研究されており、この機能化については、多くの成長因子や細胞接着因子が関与していることが報告されている。特に、カルシウム依存性の細胞間接着分子

の一つである Vascular endothelial (VE)-cadherin は、血管の発芽や吻合に関与することで、血管の構造的安定化に寄与していることが分かっている³⁾。

これらを背景として、筆者らは、DPSC の血管内皮細胞分化にともない発現する VE-cadherin に着目し、DPSC の脈管形成能における VE-cadherin の役割を検討するとともに、DPSC における VE-cadherin の発現動態を詳細に解析することを目指した。本稿では、これらの研究成果⁴⁾の概略を紹介する。

VE-cadherin ノックダウン DPSC の脈管形成能

DPSC の脈管形成能における VE-cadherin の役割を検討するために、short hairpin RNA (shRNA) によって VE-cadherin をノックダウンした細胞 (shVE-DPSC) を作製した。また、コントロールとして、スクランブル配列と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を導入した DPSC (shCon-DPSC) を用意した。まず、shVE-DPSC の細胞増殖能を評価したところ、通常培地および分化培地のどちらを用いて培養した場合においても、shCon-DPSC との間に有意な差はなかった。次に、血管内皮細胞への分化能をウェスタンブロッティングで評価したところ、shVE-DPSC では VE-cadherin の発現は減少するが、他の分化マーカーの発現は変化しないことが分かった（図 1A）。そこで、細胞分化に関与することで知られている Wnt カスケードへの影響について検討したところ、

* 大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座（歯科理工学教室）

本総説の内容の一部は、令和4年2月10日に開催された大阪大学歯学会第132回例会において、第24回大阪大学歯学部弓倉学術賞の受賞講演（対象論文：Sasaki JI, et al., VE-cadherin and anastomosis of blood vessels formed by dental stem cells. *J Dent Res* 99(4), 437-445, 2020.）として発表した。本研究は、日本学術振興会海外特別研究員制度（平成27年度-479）の支援のもとで行われた。

active β -catenin や LRP6 などの Wnt 関連タンパク質の発現量も変化しないことがわかった。このことから、VE-cadherin のノックダウンは DPSC の細胞増殖や血管内皮細胞分化に影響を与えないことが明らかとなった。

血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞といった生体内の脈管系を構築する細胞の発芽能を評価するために、細胞をマトリゲル上で三次元培養する手法がとられる。そこで、shVE-DPSC と shCon-DPSC をそれぞれマトリゲル上で血管内皮細胞に分化誘導したところ、shCon-DPSC はゲル内に網目状構造を形成するが、shVE-DPSC は球状の細胞塊を形成し、shVE-DPSC の発芽能が低下していることが分かった（図 1B）。

次に、shVE-DPSC と shCon-DPSC の *in vivo* における脈管形成能の違いを評価するために、ポリ乳酸多孔性スキャフォールドに各細胞を播種し、免疫不全マウスの背部皮下に移植した。その結果、shCon-DPSC を移植した試料において、宿主の血球を含む血管が GFP 陽性の細胞で形成されている組織像が観察できた。このことから、移植した DPSC が宿主の血管と吻合する機能的な血管を形成していることが示された。一方、スキャフォールド内に形成された血管の数を計測したところ、shVE-DPSC を移植した群ではコントロール群と比較して有意に減少していた。これら *in vitro* および *in vivo* で検討した結果をまとめると、VE-cadherin は DPSC の脈管形成能、すなわち DPSC 由来血管の発芽や吻合といった機能化に重要であることが分かった。

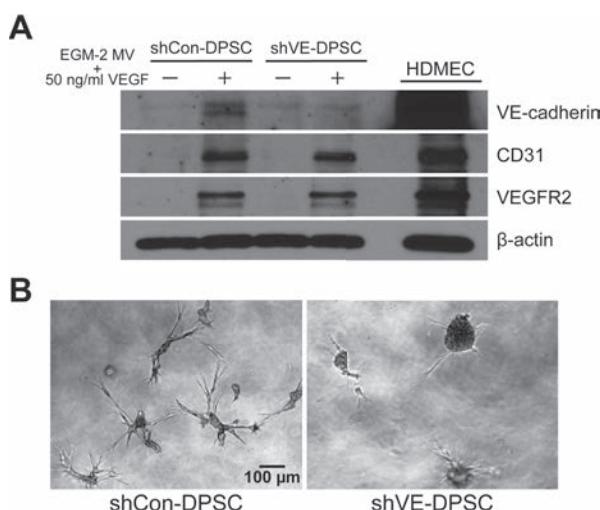


図 1 VE-cadherin ノックダウン DPSC (shVE-DPSC) の脈管形成能

(A) ウェスタンブロッティング、(B) マトリゲルを用いた三次元培養

MEK/ERK シグナル伝達が VE-cadherin の発現に与える影響

間葉系幹細胞の血管内皮細胞分化において、MEK/ERK シグナル伝達が重要な役割を担っていることが知られている⁵⁾。そこで、MEK/ERK シグナル伝達が DPSC の VE-cadherin 発現にも影響を与えていたのではないかとの着想のもと、MEK/ERK シグナル伝達を中心に VE-cadherin の発現メカニズムの解析に取り組んだ。まず、前述した手法と同様に、shRNA を用いて MEK1 をノックダウンした細胞 (shMEK-DPSC) を作成した。二次元培養系で shMEK-DPSC の性状を評価したところ、通常培養および分化誘導下で shCon-DPSC と比較して細胞の形態や増殖に有意な差はみられなかった。一方、shMEK-DPSC の血管内皮細胞への分化能を評価した結果、VE-cadherin のみならず CD31 や Tie2 といった他の血管内皮細胞分化マーカーの発現も減少することが明らかとなった。さらに、マトリゲルを用いて shMEK-DPSC を三次元培養すると、発芽能が低下した shVE-DPSC と同様の挙動を呈した。これらのことから、DPSC の血管内皮細胞分化が MEK/ERK シグナル伝達によって制御されている可能性が示された。

そこで、MEK/ERK シグナル伝達が DPSC の血管内皮細胞分化に与える影響を詳細に検討するために、阻害剤を用いたアプローチをとった。具体的には、PI3K/Akt シグナル伝達の阻害剤である LY294002、および MEK/ERK シグナル伝達の阻害剤である UO126 を添加した分化培地で DPSC を培養し、細胞増殖能や分化能の変化を評価した。その結果、PI3K 阻害剤の培地への添加は、DPSC の pAkt の発現量が減少することで細胞増殖能を低下させるものの、分化マーカーの発現や発芽能には影響を与えたなかった。一方、UO126 添加培地で培養した DPSC は、pERK に加えて分化マーカーの発現が減少し、発芽能も低下することが明らかとなった。このことは、UO126 の添加が DPSC の血管内皮細胞分化を阻害したことを見出しており、shRNA を用いたアプローチで得られた結果と同様に、DPSC の血管内皮細胞分化に MEK/ERK シグナル伝達が必要であることが示された。

MEK/ERK シグナル伝達が 転写因子 ERG の発現に与える影響

血管内皮細胞において、VE-cadherin のプロモーター

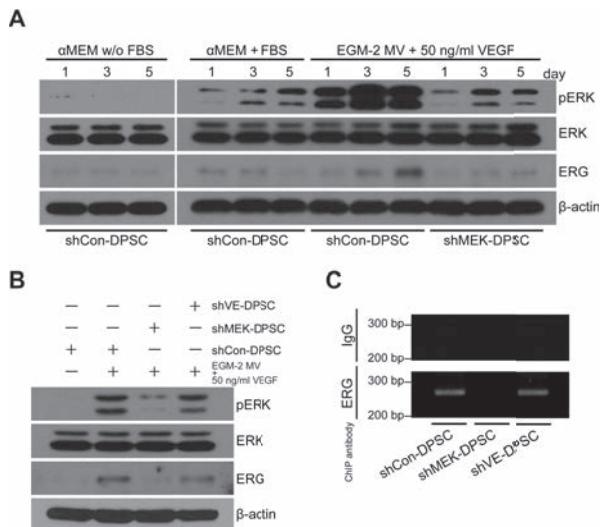


図 2 MEK/ERK シグナル伝達が転写因子 ERG の発現に与える影響

(A) 最長 5 日間培養した各細胞によるウェスタンプロット解析、(B) 培養 7 日目の各細胞によるウェスタンプロット解析、(C) ChIP アッセイ

領域に転写因子 ERG が結合することで、VE-cadherin の発現が開始することが知られている⁶⁾。そこで、DPSC における MEK/ERK シグナルの活性化と ERG の発現動態を詳細に調べたところ、shMEK-DPSC では shCon-DPSC と比較して、培地交換によって生じる pERK の発現が有意に少ないことがわかった。一方、培地交換後最長 120 分間の ERG の発現を観察したところ、発現量の経時的な変化はみられず、また両細胞間に大きな違いもみられなかった。そこで、培養最長 5 日間の試料を作製し、さらなる検討を行った結果、shCon-DPSC では ERG の発現量が大きく増加する傾向を示したが、shMEK-DPSC では培養 1 日目から 5 日目までの間にわずかしか増加しないことが分かった（図 2A）。また、MEK/ERK シグナル伝達に変化がないと考えられる shVE-DPSC についても検討したところ、shCon-DPSC と比較して、培養 7 日目で pERK と ERG の発現に大きな変化がみられないことが分かった（図 2B）。これらの結果から、DPSC における MEK/ERK シグナル伝達は、転写因子 ERG の発現に関与していることが示された。

転写因子と DNA の結合は、クロマチン免疫沈降（ChIP）アッセイで観察することができる。この ChIP アッセイは、ホルマリン固定した細胞からタンパク質と DNA の複合体であるクロマチンを抽出し、ターゲットとする転写因子の抗体で精製、さらにそこから分離した DNA を PCR 法で検出するという手法である。本

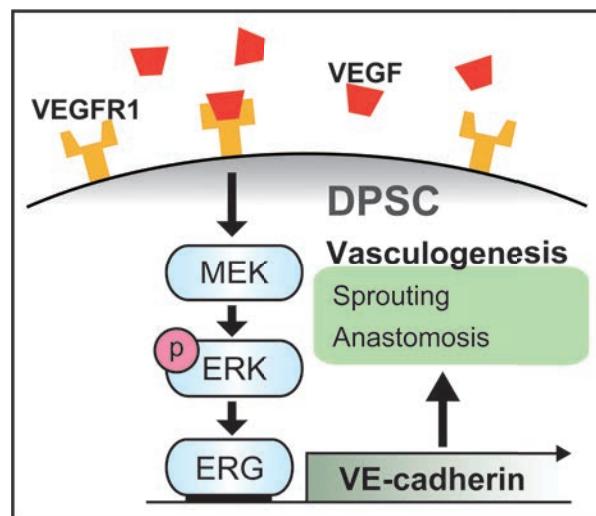


図 3 VEGF を起点とする DPSC 脈管形成能の発現

研究では、ChIP アッセイを用いて、DPSC が発現する ERG が VE-cadherin のプロモーターに結合しているかを検討した。その結果、shCon-DPSC と shVE-DPSC では、プロモーターのバンドが確認でき、ERG が VE-cadherin のプロモーターに結合していることが示された（図 2C）。一方、shMEK-DPSC では培養 7 日目においても、ERG と VE-cadherin プロモーターの結合は観察できなかった。これらの結果から、ERK の活性化によって発現する転写因子 ERG が VE-cadherin のプロモーター領域に結合し、VE-cadherin の発現に関与していることが示唆された。以上のように、本研究により、MEK/ERK シグナル伝達は DPSC の血管内皮細胞分化や転写因子 ERG の発現に必要であり、さらに ERG のプロモーターへの結合によって発現する VE-cadherin は、DPSC 由来血管の発芽や吻合といった機能化、すなわち DPSC の脈管形成能に重要であることが示された（図 3）。

おわりに

本稿では、DPSC の血管内皮細胞への分化メカニズム解析と DPSC が血管として機能するために必要となる因子を探索する研究プロジェクトの一端を紹介した。現在、筆者は、DPSC を取り巻く細胞外基質が脈管形成能にどのような影響を与えており、その影響を解析を進めるとともに、DPSC の脈管形成能を活かした生体材料開発にも取り組んでいる⁷⁻⁹⁾。これらから得られる知見を、臨床の現場に届けることを目指して研究を展開していきたいと考えている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に対して、終始ご指導を賜りましたミシガン大学歯学部 Jacques E. Nör 教授に心より感謝申し上げます。また、多くのご助言をいただきました Nör 研究室 Zhaocheng Zhang 博士および Min Oh 博士に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Sakai, V.T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K.G., Machado, M.A., Shi, S., Santos, C.F. and Nör, J.E. (2010): SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*, **89**, 791–796.
- 2) Zhang, Z., Nör, F., Oh, M., Cucco, C., Shi, S. and Nör, J.E. (2016): Wnt/β-Catenin signaling determines the vasculogenic fate of postnatal mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **34**, 1576–1587.
- 3) Lenard, A., Ellerstsdottir, E., Herwig, L., Krudewig, A., Sauteur, L., Belting, H.G. and Affolter, M. (2013): *In vivo* analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev Cell*, **25**, 492–506.
- 4) Sasaki, J.I., Zhang, Z., Oh, M., Pobocik, A.M., Imazato, S., Shi, S. and Nör, J.E. (2020): VE-cadherin and anastomosis of blood vessels formed by dental stem cells. *J Dent Res*, **99**, 437–445.
- 5) Bento, L.W., Zhang, Z., Imai, A., Nör, F., Dong, Z., Shi, S., Araujo, F.B. and Nör, J.E. (2013): Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J Dent Res*, **92**, 51–57.
- 6) Birdsey, G.M., Dryden, N.H., Amsellem, V., Gebhardt, F., Sahnani, K., Haskard, D.O., Dejana, E., Mason, J.C. and Randi, A.M. (2008): Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood*, **111**, 3498–3506.
- 7) Itoh, Y., Sasaki, J.I., Hashimoto, M., Katata, C., Hayashi, M. and Imazato, S. (2018): Pulp regeneration by three-dimensional dental pulp stem cell constructs. *J Dent Res*, **97**, 1137–1143.
- 8) Katata, C., Sasaki, J.I., Li, A., Abe, G.L., Nör, J.E., Hayashi, M. and Imazato, S. (2021): Fabrication of vascularized DPSC constructs for efficient pulp regeneration. *J Dent Res*, **100**, 1351–1358.
- 9) Zhang, Z., Oh, M., Sasaki, J.I. and Nör, J.E. (2021): Inverse and reciprocal regulation of p53/p21 and Bmi-1 modulates vasculogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Cell Death Dis*, **12**, 644.
- 10) Sasaki, J.I., Abe, G.L., Li, A., Matsumoto, T. and Imazato, S. (2021): Large three-dimensional cell constructs for tissue engineering. *Sci Technol Adv Mater*, **22**, 571–582.