

グリコサミノグリカンが脈管形成機構に及ぼす影響の解明

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）

佐々木 淳一

Vasculogenesis is referred to as the assembling of stem cells and endothelial progenitor cells into endothelium and subsequent formation of nascent capillaries. The elucidation of vasculogenesis of stem cells will facilitate control of neovascularization and further development of novel cosmetics as well as tissue regenerative therapies. Heparan sulfate (HS) proteoglycans, which are composed of HS glycosaminoglycan chains and covalently attached core protein, are a widely distributed constituent of extracellular matrices in all mammalian tissues. HS could enhance the binding affinity between growth factors and related receptors to modulate a variety of biological activities, however little is known about the role of HS in endothelial differentiation and neovascularization of mesenchymal cells. Dental pulp stem cells (DPSCs), which are classified as mesenchymal stem cells, are highly proliferative and exhibit a multipotent differentiation ability. Notably, owing to constitutive expression of vascular endothelial growth factor receptor 1, DPSCs more readily differentiate into vascular endothelial lineages compared with other mesenchymal cells. In this study, we hypothesized that HS highly orchestrates vasculogenesis of mesenchymal stem cells and the role of HS on endothelial differentiation was investigated by using DPSCs. It was revealed that an HS antagonist suppressed the sprouting ability and endothelial differentiation of DPSCs. Silencing of *exostosin-1* (*EXT1*), a crucial glycosyltransferase for HS biosynthesis, in DPSCs significantly altered their gene expression profile. In addition, EXT1-silenced DPSCs expressed lower levels of endothelial differentiation markers and displayed a reduced vascular formation capacity compared with control DPSCs transduced with scrambled sequences. Collectively, these findings indicate the crucial role of HS on endothelial differentiation and vasculogenesis of mesenchymal stem cells, opening new perspectives for the application of HS to novel cosmetics and regenerative medicine.

1. 緒 言

血管は健康の維持・増進に重要であるとされ、特に、血管の95%以上を占める直径20 μ m以下の毛細血管は免疫や創傷治癒に大きく関わっていることが知られている。一方で、毛細血管の数は加齢によって減少することが報告されており、真皮毛細血管の密度や機能の低下は皮膚の老化を招く。

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2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前駆細胞が発見され、脈管形成がヒト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。そういったなか、これまでに我々は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）や肝細胞増殖因子が特異的レセプターに結

合することで、間葉系幹細胞の血管内皮細胞分化が開始し、脈管形成能が発揮されることを報告してきた^{1, 2)}。しかし、これら血管の形成を促進する増殖因子やサイトカインが多く発見されている一方で、その精製タンパク質は非常に高価なうえに、強い薬理作用が故の生体安全性の問題から血管再生療法への適用は大きく制限されている。

近年の糖鎖生物学の発展によって、糖鎖と幹細胞分化の関係性が徐々に解明されつつあり、強い負電荷を有するプロテオグリカンが細胞周囲の増殖因子を捕捉することで、細胞分化を制御していることが報告された。プロテオグリカンは、1本のコアタンパク質に複数本のグリコサミノグリカンが共有結合した構造をもち、プロテオグリカンの負電荷はグリコサミノグリカンの硫酸基に由来する。すなわち、硫酸化多糖鎖であるグリコサミノグリカンの強い負電荷は、生体内で増殖因子の安定化や受容体への結合についての重要な働きを担っている³⁾。また、ヘパラン硫酸はグリコサミノグリカンのなかでも特に強い負電荷をもち、さらには間葉系幹細胞の細胞外基質にも含まれていることから、我々はヘパラン硫酸が間葉系幹細胞の脈管形成能に関与しているのではないかと着想した。

ところで、歯髄幹細胞（DPSCs）は、俗に歯の神経と呼ばれる歯髄に存在する間葉系幹細胞であり、高い増殖能と象牙芽細胞などへの分化能を有していることが知られている。また、DPSCsはVEGFのレセプターを常に発現していることから、骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞と比較して高い脈管形成能をもつことが報告されている。このように、



The Role of Glycosaminoglycan on Vasculogenesis

Jun-Ichi Sasaki

Department of Biomaterials Science,
Osaka University Graduate School of
Dentistry

DPSCsは*in vitro*で簡便に血管内皮細胞に分化誘導することが可能であり、DPSCsの脈管形成能を評価する手法も確立されている⁴⁾。

以上を背景として、本研究では、グリコサミノグリカンが間葉系幹細胞の脈管形成能を制御していると仮説を立て、DPSCsを用いてヘパラン硫酸の産生抑制が脈管形成能に及ぼす影響を*in vitro*および*in vivo*で検討することを目的とした。

2. 方 法

2. 1. ヘパラン硫酸合成阻害が脈管形成能に与える影響

DPSCsの脈管形成能発現におけるヘパラン硫酸の役割を検討するために、ヘパラン硫酸の合成阻害剤である bis-2-methyl-4-amino-quinolyl-6-carbamide (surfen) を添加した培地でDPSCsを培養し、細胞増殖や分化に与える影響を評価した。具体的には、血管内皮細胞分化誘導 (ED) 培地に1~10 μ Mのsurfenを添加し、培養皿で最長5日間培養した後に、細胞数をMTT assayで検討した。また、同様に7日間培養したDPSCsについて、血管内皮細胞分化マーカーである *VEGFA*、および幹細胞マーカーである *Nanog* のmRNA発現量をReal-time PCR法によって評価した。

さらに、マトリゲルを用いた三次元培養によってDPSCsの脈管形成能を評価した。細胞培養用24ウェルプレートに300 μ Lのゾル状のマトリゲルを注ぎ、37℃で1時間静置することでゲル化させた。このマトリゲル上にDPSCsを播種し、分化誘導によって形成された網目状構造を光学顕微鏡で最長14日間観察した。網目状構造の分岐の数および長さは、画像解析ソフトウェアImageJを用いて定量評価した。また、マトリゲルで三次元培養したDPSCsに対してLive/Dead染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

2. 2. Exostosin-1 (EXT1) 発現阻害が血管内皮細胞分化に与える影響

ヘパラン硫酸の産生を抑制したDPSCsを作製するために、糖転移酵素 *EXT1* に対する short hairpin RNA (shRNA) をレンチウイルスベクターによって導入し、DPSCsの *EXT1* 発現をノックダウンした。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) 遺伝子を導入したDPSCs (shCon-DPSCs) を用意した。 *EXT1* をノックダウンした細胞 (shEXT1-DPSCs) あるいはshCon-DPSCsをED培地で7日間および14日間培養し、 *EXT1* 発現量をReal-time PCR法で、ヘパラン硫酸産生量をEnzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)法で検討した。

また、 *EXT1* のノックダウンがDPSCsの遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析した。すなわち、ED培地で14日間培養したshEXT1-DPSCs、shCon-DPSCsからmRNAを抽出し、Novaseq 6000を用いて次世代シーケン解析を行った。さらに、ED培地で7日間および14日間培養したこれら細胞について、 *VEGFA* および *Nanog* のmRNA発現量をReal-time PCR法によって評価した。

2. 3. EXT1 発現阻害が脈管形成能に与える影響

EXT1 のノックダウンがDPSCsの細胞増殖能に与える影響を検討することを目的として、遺伝子導入した細胞を通常培養 (GC) 培地あるいはED培地を用いて二次元培養下で最長5日間培養し、細胞数を測定した。

さらに、shCon-DPSCsとshEXT1-DPSCsをマトリゲル上でED培地を用いて最長14日間培養し、形成された網目状構造の分岐の数および長さをImageJを用いて定量評価した。また同時に、100 μ g/mLのヘパラン硫酸を添加したED培地を用いてshEXT1-DPSCsを培養し、ヘパラン硫酸添加が網目状構造形成能に与える影響を検討した。

2. 4. EXT1 発現阻害が*in vivo*血管形成に与える影響

EXT1 のノックダウンがDPSCsの血管形成に与える影響を*in vivo*で評価するために、マウス血管新生モデルを用いた検討を行った。具体的には、内径8mmのポリエチレンチューブ内腔に多孔性のポリ乳酸スキャフォールドを作製し、厚さ1mmに切り出した。その内部にshCon-DPSCsあるいはshEXT1-DPSCsを播種し、重症複合免疫不全マウスの背部皮下に移植した。移植5週間後に試料を回収し、パラフィン包埋薄切切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。また、薄切切片に対して血管内皮細胞の分化マーカーであるCD31あるいはvon Willebrand Factor (vWF) とGFPの多重免疫染色を行い、スキャフォールド内に形成された血管数を評価するとともに、分化マーカー陽性細胞とGFPの局在についても検討した。

3. 結果と考察

3. 1. HS合成阻害が脈管形成能に与える影響

ヘパラン硫酸合成阻害剤surfenを加えたGC培地あるいはED培地を用いてDPSCsを培養したところ、培養5日目においてED培地ではsurfen濃度依存的に細胞増殖が抑制されることが分かった (図1A)。一方、GC培地では培養5日目においてもsurfenの培地添加によって細胞増殖に有意な変化は認められなかった。また、surfen含有ED培地で培養したDPSCsの血管内皮細胞分化を検討した結果、surfenの濃度が増加するにつれて *VEGFA* のmRNA

量は減少するが、幹細胞マーカー *Nanog* の発現量は増加することが分かった (図 1B)。ヘパラン硫酸は増殖因子と電氣的に結合することで、増殖因子の細胞表面の受容体への結合を補助していることが知られている。このことから、DPSCs のヘパラン硫酸合成阻害によって ED 培地に含まれる増殖因子が細胞に作用しづらくなったため、細胞増殖や血管内皮細胞分化が抑制されたと考えられた。一方、GC 培地については、DPSCs を栄養する主体が血清成分であり、増殖因子を多く含む ED 培地に比べてヘパラン硫酸産生阻害の影響が少なく、surfen は GC 培地環境下では細胞増殖に変化を与えなかったと考えられた。

マトリゲル上で DPSCs を血管内皮細胞に分化誘導した結果、毛細血管様の網目状構造が形成された (図 2A)。次に、surfen を培地に加えて三次元培養したところ、培養 3 日目以降で surfen の濃度が増加するにしたがって DPSCs によって形成される網目状構造の分岐の数および長さが有意に減少することが分かった (図 2B)。一方で、DPSCs が surfen の影響で細胞死した場合には、マトリゲル上に網目状構造が形成されなくなると考えられる。そこで、マトリゲル上で DPSCs の Live/Dead 染色を行ったところ、

10 μ M の surfen を含む ED 培地で 14 日間培養した後においても、多くの細胞が生存していることが明らかとなった (図 2C)。これらのことから、DPSCs を surfen 添加培地で培養することで、血管内皮細胞分化および網目状構造を形成する能力、すなわち脈管形成能が低下したことが示唆された。

3. 2. EXT1 発現阻害が血管内皮細胞分化に与える影響

EXT1 発現を shRNA でノックダウンできているか調べたところ、培養 7 日目、14 日目のいずれにおいても、shEXT1-DPSCs の *EXT1* 発現量は shCon-DPSCs と比較して有意に低かった (図 3A)。さらに、ELISA 法の結果からも、shEXT1-DPSCs のヘパラン硫酸産生量が減少していることが分かった (図 3B)。これらの結果から、shRNA によって DPSCs の *EXT1* 発現がノックダウンされ、ヘパラン硫酸の産生が阻害されていることが分かった。

次に、次世代シーケンス解析を行ったところ、*CD106* や *TGF- β 1*、ケモカインなど接着因子や炎症反応に関わる遺伝子群の発現が shEXT1-DPSCs で有意に減

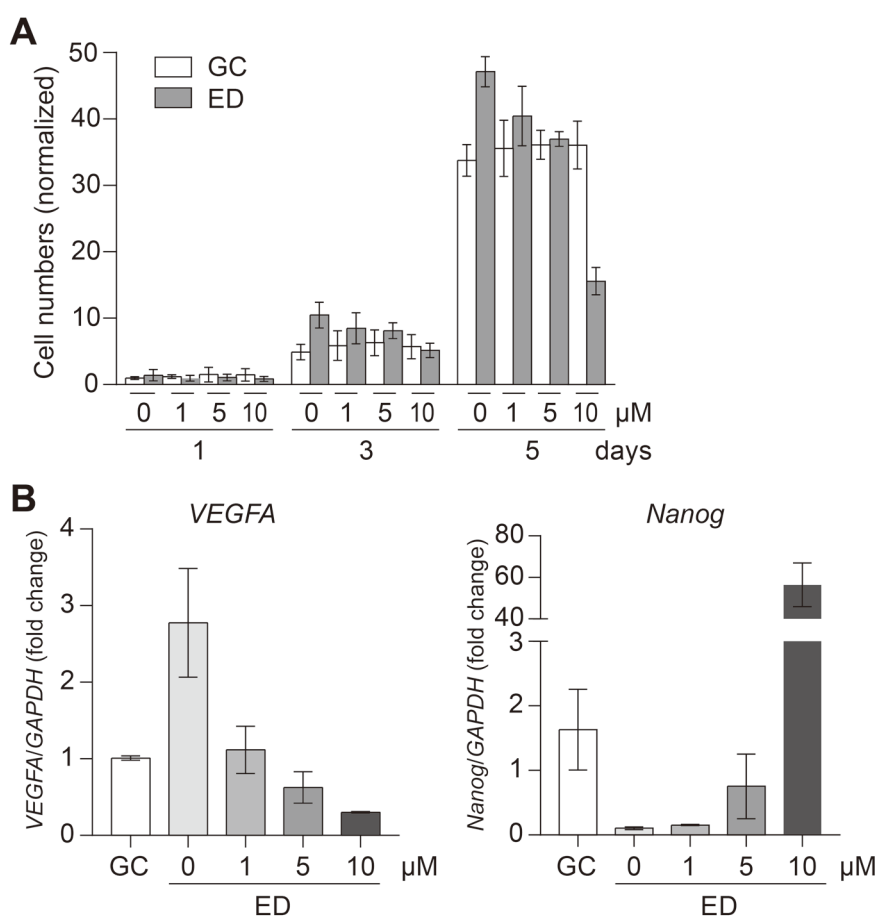


図 1 Surfen が DPSCs の細胞増殖と血管内皮細胞分化に与える影響
A. 細胞増殖試験 B. Real-time PCR 法

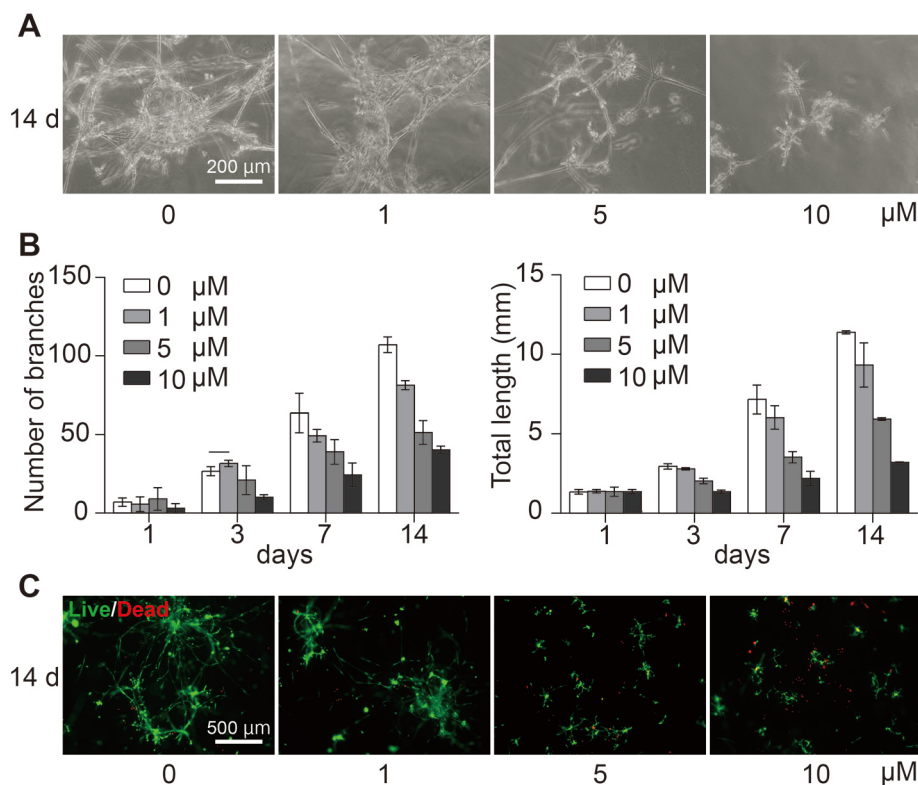


図2 Surfen が三次元培養環境下の DPSCs に与える影響
A. 光学顕微鏡像 B. 網目状構造の定量評価 C. Live/Dead 染色

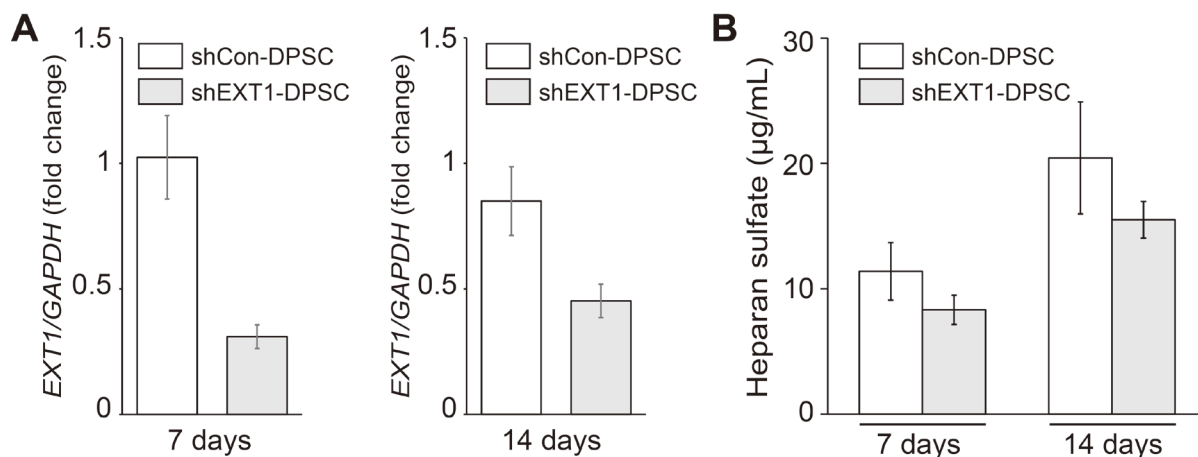


図3 DPSCs の *EXT1* ノックダウン
A. *EXT1* 発現量 B. ヘパラン硫酸産生量

少していることが明らかとなった(図4A)。また、Real-time PCRで血管内皮細胞分化に関連する遺伝子発現を調べた結果、surfenを作用させた場合と同様に、shEXT1-DPSCs で *VEGFA* 発現量が減少し、*Nanog*が増加していることが分かった(図4B)。このことから、*EXT1* のノックダウンによってヘパラン硫酸の産生を抑制することは、DPSCsの血管内皮細胞分化のみならず細胞接着や免疫といった様々な細胞機能に影響を与える可能性が考えられた。

3.3. *EXT1* 発現阻害が脈管形成能に与える影響

shRNAを用いた逆遺伝学的アプローチによって、shEXT1-DPSCsではヘパラン硫酸の産生が減少し、血管内皮細胞分化が抑制されることが明らかとなった。そこで、三次元培養系でshEXT1-DPSCsが形成する網目状構造を観察したところ、shCon-DPSCsと比較して分岐の数や長さが減少することが明らかとなった(図5)。一方、ヘパラン硫酸を添加したED培地でshEXT1-DPSCsを培養する

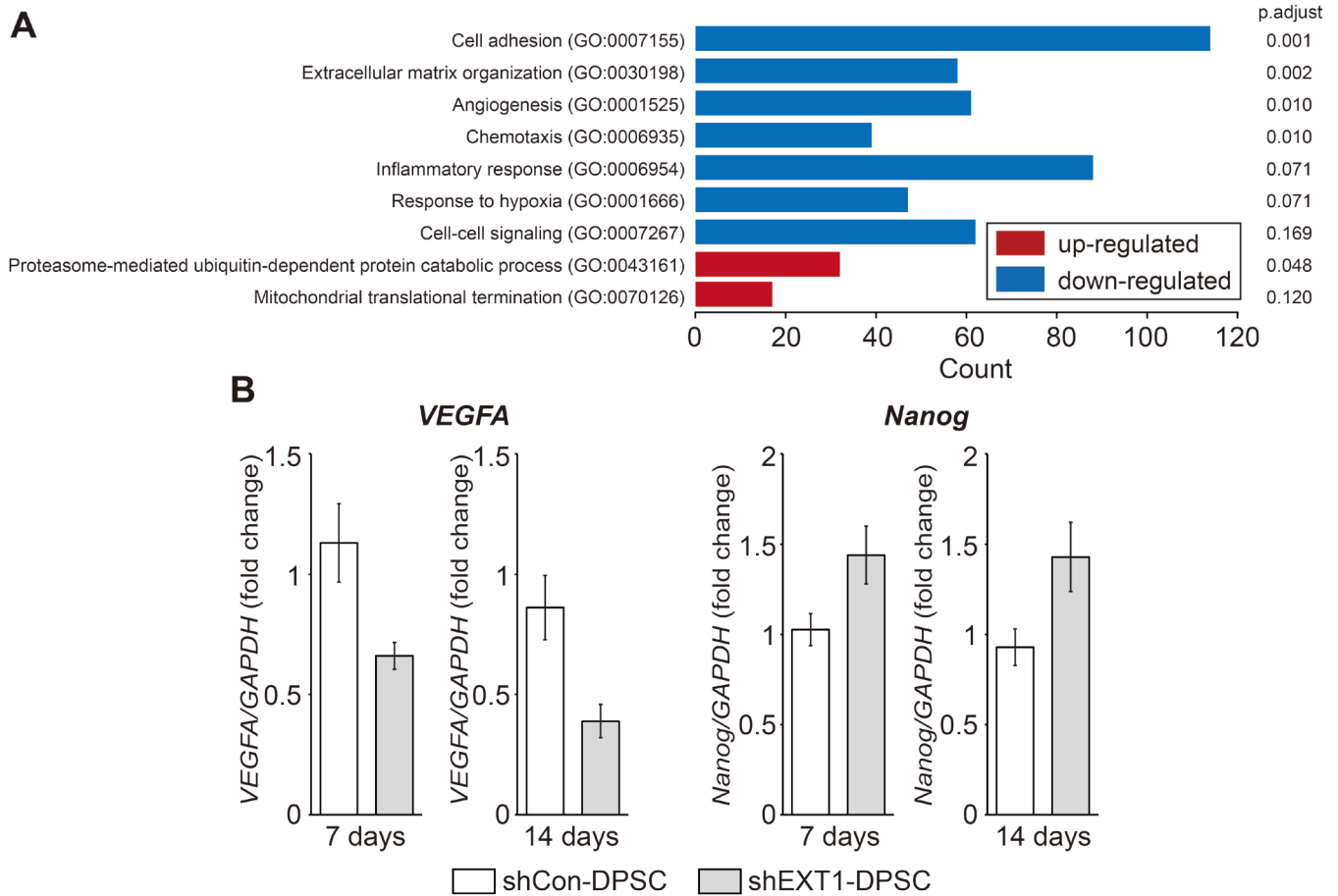


図4 EXT1 ノックダウンによる DPSCs の遺伝子発現変化
A. 次世代シーケンス解析 B. Real-time PCR 法

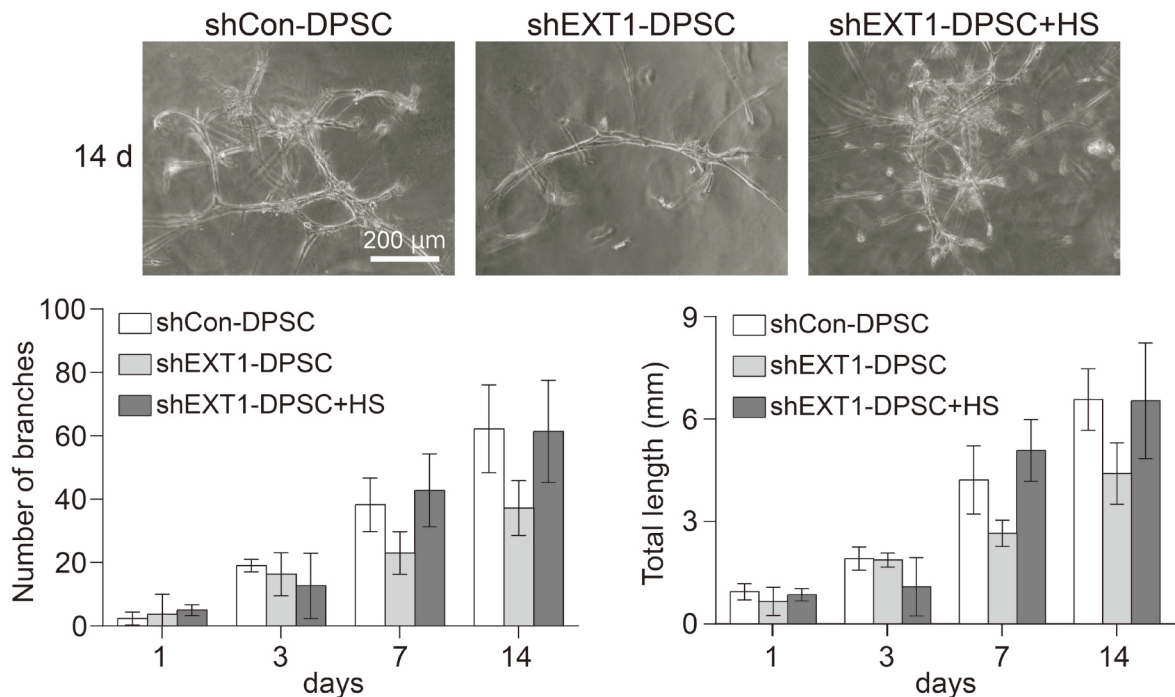


図5 shEXT1-DPSC の網目状構造形成能とヘパラン硫酸(HS)添加の効果

と、shCon-DPSCsが形成する網目状構造と比べて、その数や長さに有意な差が認められなくなった。この結果は、*EXT1* のノックダウンによって低下したDPSCsの網目状構造形成能が培地中に添加したヘパラン硫酸によってレスキューされたことを示しており、この結果は、DPSCsの脈管形成能にヘパラン硫酸が関与していることを示唆している。

3. 4. *EXT1* 発現阻害が*in vivo*血管形成に与える影響

これまでの結果から、DPSCsの脈管形成能の発現には、ヘパラン硫酸が重要な役割を担っていることを*in vitro*の実験系で示すことができた。そこで、これらの*in vitro*で見られた現象が*in vivo*でも生じることを確認するために、マウス血管新生モデルを用いた評価を行った。その結果、sh*EXT1*-DPSCsを播種したスキャフォールド内に形成された血管の数は、shCon-DPSCsを移植した試料と比較して有意に減少することが分かった(図6A)。さらに、多重免疫染色の結果、移植した試料内にCD31やvWFといった血管内皮細胞分化マーカーとGFPを共発現しているDPSCsが存在していることが明らかとなった(図6B)。このことは、移植したDPSCsが血管内皮細胞に分化したこ

と、さらにはDPSCsのヘパラン硫酸産生を阻害することで血管の形成量が減少したことを示している。これらの結果から、生体内においてヘパラン硫酸がDPSCsの脈管形成能を制御している可能性が示された。

4. 総 括

本研究では、グリコサミノグリカンの一つであるヘパラン硫酸が脈管形成に与える影響を間葉系幹細胞の一つであるDPSCsを用いて検討した。その結果、DPSCsによるヘパラン硫酸の産生を阻害することで、DPSCsの脈管形成能が低下し、DPSCsによって形成される血管量が減少することが示された。このことは、ヘパラン硫酸がDPSCsの血管形成、すなわち間葉系幹細胞の脈管形成能の発現に重要であることを示唆している。以上のことから、ヘパラン硫酸が間葉系幹細胞由来の血管の増生に有効であり、本研究で得られた知見が、新たな血管再生療法の確立や血行を促進する化粧品の開発に応用できる可能性が示された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

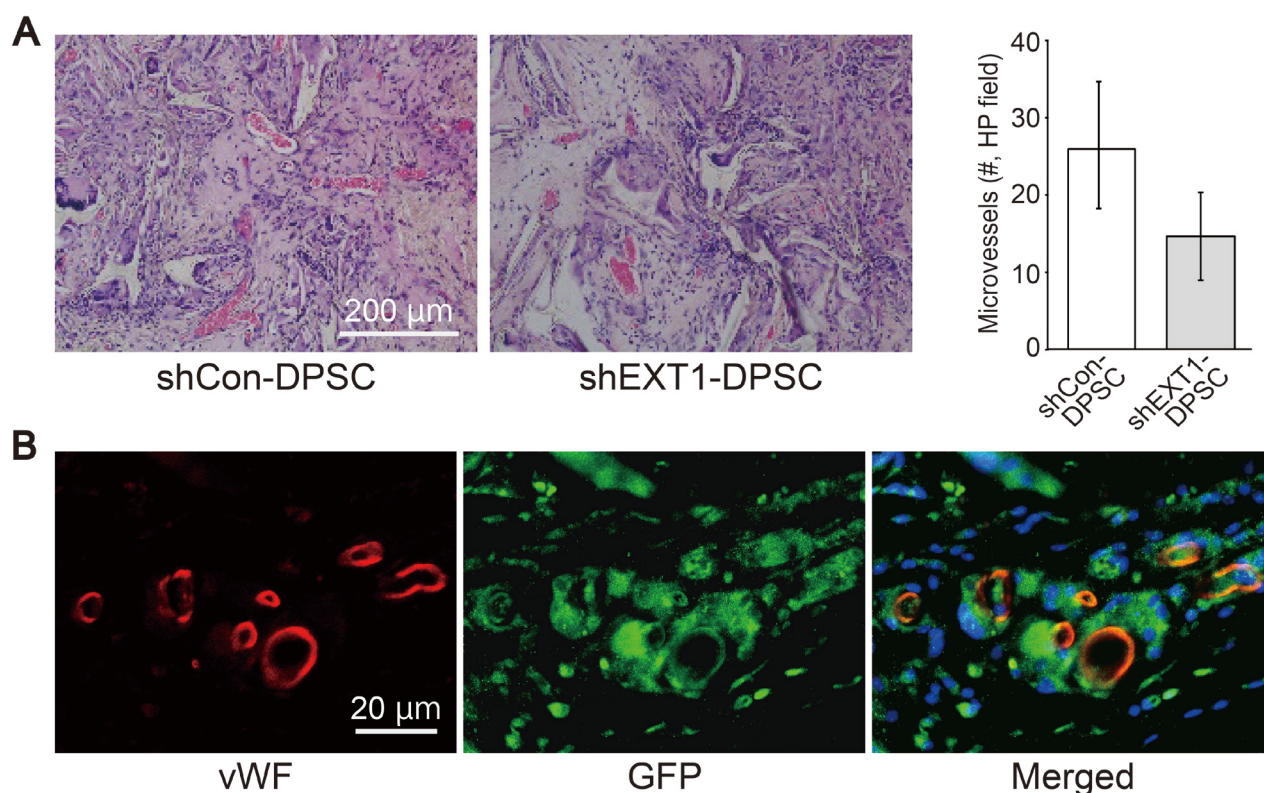


図6 shEXT1-DPSCの*in vivo*脈管形成能
A. HE染色および血管形成量評価 B. vWFとGFPの多重免疫染色

(引用文献)

- 1) Sasaki JI, Zhang Z, Oh M, Pobocik AM, Imazato S, Shi S, Nör JE. VE-cadherin and anastomosis of blood vessels formed by dental stem cells. *J Dent Res* 99 (4), 437-445, 2020.
- 2) Zhang Z, Oh M, Sasaki JI, Nör JE. Inverse and reciprocal regulation of p53/p21 and Bmi-1 modulates vasculogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Cell Death Dis* 12 (4), 644, 2021.
- 3) Li A, Sasaki JI, Inubushi T, Abe GL, Nör JE, Yamashiro T, Imazato S. Role of heparan sulfate on vasculogenesis of dental pulp stem cells. *J Dent Res* 102 (2), 207-216, 2023.
- 4) Katata C, Sasaki JI, Li A, Abe GL, Nör JE, Hayashi M, Imazato S. Fabrication of vascularized DPSC constructs for efficient pulp regeneration. *J Dent Res* 100 (12), 1351-1358, 2021.