OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯周組織におけるリンパ管の解析
Author(s)	松本, 修治
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87972
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　松本　修治　　）	
論文題名	歯周組織におけるリンパ管の解析

論文内容の要旨

【研究目的】

リンパ管は組織液の恒常性維持および免疫担当細胞・老廃物のクリアランスを担うだけでなく、組織損傷後の治癒を促進し、組織再生を誘導することが示唆されている。しかしながら歯周組織におけるリンパ管の動態や機能については不明な点が多く残されている。一方で、血管やリンパ管は組織内で三次元的なネットワークを形成しており、従来の組織切片を用いた二次元の観察ではその全体像の理解は困難である。そこで、本研究ではリンパ管の蛍光レポーターマウスや同マウスから単離した初代培養細胞を用いて、歯周組織の正常時・損傷時・修復時のリンパ管の動態や機能を検討するとともに、組織透明化技術を応用し、リンパ管ネットワークを三次元的に可視化することで、歯周組織の恒常性維持および損傷修復過程におけるリンパ管の役割を検討することを目的とした。

【材料および方法】

歯周組織のリンパ管と血管を生体内で可視化して観察を行うために、リンパ管内皮細胞に赤色蛍光タンパク質が発現する*Prox1-tdTomato*マウス、血管内皮細胞に緑色蛍光タンパク質が発現する*Tie2-GFP*マウス、ならびにそれらを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスを用いた。まず8週齢の*Tie2-GFP*; *Prox1-tdTomato*マウスの上顎骨の凍結組織切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。次いで、リンパ管が組織損傷に応答して増殖するのか検討するため、*Prox1-tdTomato*マウスの上顎左側第二臼歯に1週間5-0絹糸を結紮し、結紮除去後における組織修復過程について、右側を対照側として経時的に解析した。

組織透明化技術を歯周組織に適用するプロトコルを確立するため、8週齢の野生型マウス上顎骨を採取し、4%パラホルムアルデヒドによる固定および各種脱灰液による脱灰を行った後、SeeDB2法、CUBIC法、Scale法それぞれを用いて透明化処理を行い、その組織透明度を比較検討した。脱灰法についてはモールス液およびEDTAが組織透明度に与える影響を検討した。次いで、蛍光レポーターマウスを用いた細胞の蛍光標識や蛍光核染色について、その蛍光シグナルが透明化処理および脱灰処理後に保持されるかどうか検討した。さらにライトシート蛍光顕微鏡を用いて三次元画像を取得した。確立した組織透明化プロトコルを応用し、*Prox1-tdTomato*マウスの組織修復過程の三次元観察を行った。

さらにリンパ管を誘導する主なサイトカインであるVegfcについて解析を行うためRNAscope *in situ* hybridization法により*Vegfc* mRNA発現細胞の局在を解析した。次いで、野生型マウスの上顎左側第二臼歯に1週間5-0絹糸を結紮し、結紮除去時にVEGF-C C156Sの局所投与を行った。結紮除去3日後にマイクロCTにより歯槽骨吸収量を定量解析することにより、歯槽骨の修復にリンパ管誘導因子がいかに寄与するか検討した。

加えて歯肉由来リンパ管内皮細胞の単離を行うために、*Prox1-tdTomato*マウスより歯肉を剥離し、酵素処理を行うことにより細胞懸濁液を得て、セルソーターにて*tdTomato*陽性細胞を単離した。同細胞について、リンパ管特異的マーカーであるLyve-1抗体を用いた細胞免疫染色およびマトリゲルを用いた三次元培養を行った。さらに同細胞をVEGF-C C156S含有もしくは非含有にて24時間培養し、その遺伝子発現についてRNA-seq解析を行った。

【結果および考察】

*Tie2-GFP; Prox1-tdTomato*マウスの組織学的解析により、歯肉上皮下の結合組織部において血管と並走して多くのリンパ管が観察された。同マウスの歯周組織修復過程を解析したところ、結紮除去直後には結紮側でリンパ管の減少を認めた一方で、組織修復の後期にあたる結紮除去7日目においては対照側と比べてリンパ管が増加していた。

次いで、三次元観察によりリンパ管ネットワークを解析するために、歯周組織の組織透明化プロトコルの条件検討を行ったところ、脱灰液については、モールス液・EDTAいずれも高い透明度を得られたが、モールス液による脱灰に比べてEDTAによる脱灰が蛍光強度をより高く維持した。また、透明化試薬については、CUBIC法を用いた場合に組織透明度が最も高かった。さらにEDTAによる脱灰後、CUBIC法にて透明化した歯周組織はライトシート蛍光顕微鏡において、歯周組織全体を蛍光イメージングすることが可能であった。そこで、*Prox1-tdTomato*マウスの観察に同手法を適用し、組織修復の中期にあたる結紮除去3日目のリンパ管を観察したところ、対照側においては、口蓋歯肉から辺縁歯肉へとリンパ管ネットワークが存在していることが示され、さらに結紮側においては、そのネットワークがより密に観察された。

このリンパ管の増加のメカニズムを検討するために、RNAscope解析を行ったところ、対照側と比べて結紮側の歯肉上皮において、より多くの*Vegfc* mRNA発現を認めたことから、リンパ管は歯肉上皮由来のVegfcによって誘導されている可能性が示唆された。次いで、VEGF-C C156Sを絹糸結紮除去時に口蓋歯肉に局所投与し、絹糸除去3日目にμCT三次元構築像上で歯槽骨吸収量の定量解析を行ったところ、PBS投与群と比べてVEGF-C C156S投与群において結紮側の歯槽骨吸収が有意に減少した。このことよりVEGF-Cシグナル経路活性化によりマウス歯周組織修復が促進される可能性が示唆された。

さらに*Prox1-tdTomato*マウスの歯肉上皮より単離した*tdTomato*陽性細胞を*in vitro*において解析したところ、Lyve-1タンパク質と*tdTomato*発現との共局在が観察された。さらに、培養した細胞を三次元培養することでネットワークを形成することが確認され、歯肉リンパ管内皮細胞の機能やその分子メカニズム解明に有用な培養細胞の単離・培養に成功した。樹立した培養リンパ管内皮細胞を用いて、VEGF-C C156S刺激が同細胞に与える影響を検討するため、VEGF-C C156S存在下および非存在下で24時間培養後、RNA-seq解析を行った。その結果、VEGF-C C156S群で発現が統計学的に有意に変動する遺伝子を20個同定した。同遺伝子のGO解析により、VEGF-C C156S刺激がアポトーシスに関与することが示唆された。

【結論】

歯周組織のリンパ管の動態を検討した結果、通常時、歯肉の結合組織部の血管周囲に走行しているリンパ管は歯周組織損傷後の修復過程において増生することが明らかとなった。さらに同修復過程はリンパ管を誘導するVEGF-C C156S局所投与により有意に促進され、培養歯肉リンパ管内皮細胞を用いた*in vitro*解析により、VEGF-C C156Sによる修復促進作用には歯肉リンパ管内皮細胞のアポトーシス抑制が関与している可能性が示唆された。また、組織透明化技術を応用することにより、マウス歯周組織全体の網羅的かつ迅速な観察が可能となり、歯周組織のリンパ管は口蓋歯肉部から辺縁歯肉にかけてネットワークを形成していることが可視化された。今後のさらなる解析により、リンパ管を介した歯周組織の恒常性維持機構や修復機構の理解が進むものと期待できる。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　松本　修治　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教　授	村上　伸也
	副査　教　授	吉田　篤
	副査　准教授	前田　隆史
	副査　講　師	佐々木　淳一

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周組織の正常時・損傷時・修復時のリンパ管の役割について、蛍光レポーターマウスや組織透明化技術を用いて、その三次元的なネットワークを解析するとともに、リンパ管誘導因子が歯周組織の創傷治癒過程に及ぼす影響を解析したものである。

その結果、歯周組織のリンパ管は口蓋歯肉部から辺縁歯肉にかけてネットワークを形成しており、歯周組織損傷後の修復過程において増生することが明らかとなった。また、損傷を受けた歯肉上皮ではリンパ管誘導因子の発現が増加していること、リンパ管誘導因子を局所投与することで、リンパ管内皮細胞のアポトーシスが制御され、歯周組織の治癒が促進することが示唆された。

これらの研究成果は、リンパ管を介した歯周組織の恒常性維持機構や修復機構の理解を深め、歯周組織再生療法の開発につながる基盤情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。