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

学位論文

歯周組織におけるリンパ管の解析

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

口腔分子免疫制御学講座　歯周病分子病態学

松本　修治

（指導教員：村上 伸也 教授）

緒言

脊椎動物には血管系とリンパ管系の 2 つの脈管循環系が存在しており、血管により末梢組織に血球等が供給される一方で、リンパ管により細胞間質液や組織の代謝産物とともに免疫担当細胞等が末梢組織から運搬され、リンパ節を経由し、最終的に鎖骨下静脈に流れ込み、血液循環系に合流する [1)]。リンパ管は Prox1、Lyve-1、Podoplanin を発現するリンパ管内皮細胞から構成されており、その新生はリンパ管内皮細胞上の血管内皮細胞増殖因子受容体 3（VEGFR-3）を介した血管内皮細胞増殖因子 C（VEGF-C）シグナル経路によって制御され、その欠損や機能不全は組織浮腫を引き起こすことが知られている [2,3)]。さらに、近年まで中枢神経系においてはリンパ管が存在しないとされてきたが、2015 年にリンパ管を蛍光標識するマウスを使用することで、硬膜静脈洞の内表面に機能的なリンパ管が存在し、髄液と免疫担当細胞を運搬していることが初めて示された [4)]。加えて、最近になり、組織損傷を受けた様々な組織が修復される過程においてもリンパ管が重要な役割を担っていることが報告されている。心臓においては、リンパ管がマウスの心筋の成長、修復を促進することが報告 [5)]され、皮膚毛嚢においては、リンパ管は皮膚幹細胞が存在する微小環境として機能しており、皮膚の再生時にはリンパ管が皮膚幹細胞の機能を制御していること [6)]や VEGF-C 投与によってリンパ流が促進されることにより、皮膚の慢性炎症が制御されるという報告 [7)]がなされている。このようにリンパ管ネットワークの多様な機能や意義に注目が集まっている。

歯周組織においてもリンパ管が存在していることが免疫組織染色により示されている [8)]。また、正常状態および炎症急性期のマウス歯肉における組織液バランスに、歯肉リンパ管が重要な役割を演じていることが報告 [9)]され、歯周組織においても一般的なリンパ管と同様に組織液の調節の役割を担っていると考えられる。また歯周炎マウスモデルにおいては組織におけるリンパ管形成が活発となり、その発達には VEGF-C [10)]やマスト細胞 [11)]が寄与していると報告されている。さらにリンパ管欠損マウスに *Porphyromonas gingivalis* を経口感染させると、野生型のマウスと比べて骨吸収が増加する [12)]ことから、リンパ管の機能が歯周炎の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方で、リンパ管の増加が歯周炎による歯槽骨吸収に与える影響については、上皮特異的 *Vegfc* 発現トランスジェニックマウスでは改善を認めなかった [13)] のに対し

て、*Vegfc* 発現アデノウイルスを投与した場合では改善を認めることが報告[14]され、歯槽骨代謝におけるリンパ管の機能について明確な結論は得られていない。さらに歯周組織の修復過程におけるリンパ管の役割についてはほとんど検討されていない。

リンパ管は三次元的にネットワークを形成するため、その全貌を観察するためには、従来、連続組織切片作製と撮影後の再構築が行われてきた。しかしながら、切片作製時に歪みが生じたり、再構築のための位置合わせが困難であったりすることから、多大な労力が必要となるにも関わらず、これまでのところ歯周組織のリンパ管の組織俯瞰的かつ三次元的なネットワークについての正確な情報が得られていない。この技術的な問題を解決するために、現在新しい組織解析法として、組織透明化技術の開発が進められている。主な方法としては、尿素・グリセリン・界面活性剤を組み合わせた Scale 法[15]や、Scale 法での試薬を再検討して透明度を更に高めた CUBIC 法[16]、濃度の異なるフルクトース溶液に順番に浸漬することで操作を簡便にして組織の形態保持を図った SeeDB 法や、それを改良した SeeDB2 法[17]などがこれまでに報告され、多くの分野で新たな成果を挙げている。例えば、CUBIC 法を用いてマウス全身を透明化し、筋ジストロフィー症のモデルについて解析を行った報告[18]や透明化処理過程において免疫染色を試みた報告[19]、SeeDB2 法を用いてマウス大脳皮質を透明化し、神経回路の観察を行った報告[20]があるように、上記の透明化手法の応用により様々な組織において神経脈管系のネットワーク観察が可能になっている。また最近ではポリエチレングリコールを用いた PEGASOS 法[21]が報告されており、歯周組織においても、インプラント埋入後のマウス下顎を透明化して観察した報告[22]がなされている。

そこで本研究では、リンパ管蛍光レポーターマウスを用いて歯周組織におけるリンパ管の平常時、損傷時、修復時における動態を明らかにすることを目的として、従来の組織切片を用いた観察法や透明化技術を歯周組織に応用した新規観察法にて解析を行った。さらに歯周病モデルマウスへの VEGF-C 投与が歯周組織修復に寄与するか検討するとともに、VEGF-C が歯肉リンパ管内皮細胞に与える影響を *in vitro* にて検討することを目的に同細胞の単離・初代培養を行った。

材料および方法

1. マウス

本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会および大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行った（動物実験承認番号：動歯 R-02-012-0 および動歯 31-001-0、遺伝子組換え実験承認番号：4449）。*Prox1-tdTomato* マウス（ストック番号#018128）、*Tie2-GFP* マウス（ストック番号#003658）はジャクソン研究所（Bar Harbor、ME、USA）より入手した。対照として、C57BL/6J マウスを日本エスエルシー（静岡、日本）より入手した。*Col-GFP* マウスは David Brenner 教授より供与を受けた。本研究には 6–10 週齢の上記マウスを雌雄は問わずに実験に供した。

2. 凍結切片の作製

CO_2 ガスを用いて安楽死させたマウスを 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（富士フイルム和光純薬、大阪、日本、#163-20145、以下 4%PFA と略す）を用いて灌流固定し、上顎骨を採取した。同組織を 4%PFA にて一晩浸漬固定後、脱灰液 B（富士フイルム和光純薬、#041-22031、以下 EDTA と略す）にて 3 日間脱灰処理し、20%スクロース（富士フイルム和光純薬、#196-00015）溶液に浸漬し静置した。同組織をティシューテック O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン、東京、日本、#4583）にて包埋、ドライアイスで冷却したエタノール中で凍結し、クライオスタット CM3050S (Leica Microsystems、Wetzlar、Germany）を用いて厚さ 14.0 μm の薄切切片を作製した。薄切時には切片の形状を保つため、切片支持用粘着フィルム Cryofilm（type 2C(9)、Section-lab、広島、日本）を用いた。

3. 蛍光免疫組織染色

作製した凍結切片をリン酸緩衝液（D-PBS(-)、富士フイルム和光純薬、#045-29795、以下 PBS と略す）にて洗浄後、まず Blocking One Histo（ナカライテスク、京都、日本、#06349-64）を用いてブロッキングを行った（室温、30 分間）。一次抗体にはウサギ抗赤色蛍光色素ポリクローナル抗体（1:200、ROCKLAND、Limerick、PA、USA、#600-401-379）を用いた（4℃、一晩）。二次抗体に Alexa Fluor 546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1:200、Thermo Fisher

Scientific、Waltham、MA、USA、#A11035）を用いた（室温、30 分間）。さらに核染色は DAPI（1:50,000、Sigma-Aldrich、Darmstadt、Germany、#D9542）にて、血管染色は Alexa Fluor 647 標識 Isolectin GS-IB4（1:200、Thermo Fisher Scientific、#I32450）にて行った。蛍光標識した組織切片は光学顕微鏡 ECLIPSE Ti（ニコン、東京、日本）もしくは共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8（Leica Microsystems）を用いて画像を取得した。共焦点顕微鏡撮影においては、10–14 枚の z スタック、合わせて厚さ約 5 μm）を取得し、三次元画像を最大値投影法にて示した。

4. 絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデル

三種混合麻酔薬【最終濃度 0.75 mg/kg ドミトール（日本全薬工業、福島、日本）、4 mg/kg ミダゾラム（サンド株式会社、東京、日本）、5 mg/kg ベトルファール（Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本）】を腹腔内投与し、全身麻酔下で上顎左側第二臼歯周囲に 5-0 絹糸を結紮した。処置後、拮抗薬（最終濃度 0.75 mg/kg アンチセダン（日本全薬工業））を腹腔内投与し、覚醒を促した。7 日後、再度全身麻酔下で結紮糸を除去した。そして組織修復後にあたる結紮除去後 7 日について上述の蛍光染色での観察を、組織修復中にあたる結紮除去後 3 日について以下に記すライトシート顕微鏡を用いた 3 次元観察をそれぞれ行った。

5. 歯周組織透明化における各種脱灰法の比較

4 % PFA にて固定した上顎骨について、脱灰方法の検討を行った。EDTA、Tissue-Clearing Reagent CUBIC-B [for Animals]（東京化成工業、東京、日本、#T3780、以下 CUBIC-B と略す）、モールス液（富士フイルム和光純薬、#135-13071）の 3 試薬についてそれぞれ脱灰効率を検討した。1、2、3、7 日目にそれぞれ実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2（リガク、東京、日本）にてマイクロ CT 撮影を行い、三次元画像解析ソフトウェア Amira 6.7（Thermo Fisher Scientific）にて算出した CT 値で比較を行った。X 線照射は電圧 80 kV、電流 200 μA、5 mm 視野にて 3 分間の fine モードにて実施した。

蛍光褪色の評価には蛍光マウスとして *Col-GFP* マウス、無蛍光マウスとして C57BL/6J マウスを使用した。採取した上顎骨は正中にて分割してそれぞれモールス液と EDTA に浸漬し、毎日試薬を交換するタイミングで蛍光プレートリー

ダーFLUOROSCAN ASCENT（Thermo Fisher Scientific）にて観察を行った。数値の算出は各試薬群内で蛍光マウスでの値を無蛍光マウスの値で除して導いた。

6. 歯周組織透明化法の比較

歯周組織透明化については、三種類の透明化法を下記に記す方法で使用した。透明度の比較は、透明化後の試料を格子上にて実体顕微鏡 Leica S6D（Leica Microsystems）を用いて観察した。

SeeDB2 法では 2% サポニン（Sigma-Aldrich、#S-7900）、オムニパーク 350（第一三共、日本、東京）を使用した。脱灰後の上顎骨を 2% サポニン含有の PBS にて 12 時間振盪を行った。続いて、2% サポニン含有の PBS でオムニパーク 350 を 3 倍希釈にした液中にて 6 時間振盪を行った後、2% サポニン含有の PBS でオムニパーク 350 を 2 倍希釈にした液中にて 6 時間振盪を行った。最後に 2% サポニン含有のオムニパーク 350 にて 12 時間振盪を行った。

Scale 法では SCALEVIEW-S Trial Kit（富士フイルム和光純薬、#299-79901、以下 ScaleS と略す）、deScale Solution（富士フイルム和光純薬、#041-34425）を使用した。脱灰後の上顎骨を SCALEVIEW-S0、SCALEVIEW-S1、SCALEVIEW-S2、SCALEVIEW-S3、deScale Solution、SCALEVIEW-S4 の順に 12 時間ずつ液中にて振盪を行った。その後、SCALEVIEW-SMt にて 1 時間振盪を行った。

CUBIC 法では Tissue-Clearing Reagent CUBIC-L [for Animals]（東京化成工業、#T3740、以下 CUBIC-L と略す）、Tissue-Clearing Reagent CUBIC-R+(M) [for Animals]（東京化成工業、#T3741、以下 CUBIC-R と略す）を使用した。脱灰後の上顎骨を説明書に則って洗浄、CUBIC-L、洗浄、CUBIC-R の順に透明化処理を実施した。すなわち、PBS 中で室温 2 時間の洗浄を 3 回行った後、50% CUBIC-L 液中で 37℃にて 12 時間振盪、ついで 100% CUBIC-L 液中にて 37℃・24 時間の振盪を 2 回行った。再度 PBS 中で室温 2 時間の洗浄を 3 回行った後、50% CUBIC-R 液中で 37℃にて 12 時間振盪、ついで 100% CUBIC-R 液中にて 37℃・24 時間の振盪を 2 回行った。核染色は CUBIC-L 処理後に CUBIC-HV1 3D nuclear staining kit（東京化成工業、#C3709）を使用して付属の DAPI・2HCl（1:200、東京化成工業、#D5891）もしくは Propidium Iodide（1:100、東京化成工業、#P2826）にて 3 日間室温にて行った。その後、洗浄し

CUBIC-R 処理を行った。

7. ライトシート顕微鏡観察

透明化処理を行った試料は Lightsheet7（Zeiss、Oberkochen、Germany、以下ライトシート顕微鏡と略す）で観察を行った。固定後の上顎骨および、そこから剥いだ歯肉を試料として用いた。試料をアダプターに固定し、アダプターを顕微鏡上部のサンプル挿入口より内部に垂らし、チャンバーに CUBIC-R を満たし、液中にて観察を行った。

8. 蛍光 RNA *in situ* hybridization

RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent v2 キット（Advance Cell Diagnostics（ACD）、Newark、CA、USA、#323100）および *Vegfc* プローブ（ACD、標的部位 367-1501、#492701-C2）を用いて、作製した歯周組織の凍結切片上の mRNA を検出した。蛍光抗体は TSA Plus Cyanine 3（Akoya Biosciences、Marlborough、MA、USA、# NEL744001KT）を用いた。核染色は DAPI（1:50,000）にて行った。ProLong Diamond Antifade Mountant（Thermo Fisher Scientific、#P36941）にて封入後、共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8 を用いて画像を取得した。

9. マイクロ CT による骨形態解析

固定した上顎骨を実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2 にてマイクロ CT 撮影を行った。X 線照射は電圧 80 kV、電流 200 μA、5 mm 視野にて 3 分間の fine モードにて実施した。撮影後、DICOM 形式の画像データを三次元解析ソフトウェア Drishti v2.7（Australian National University Vizlab、Canberra、Australia）にて三次元レンダリングを行った後、マウス上顎骨の第一臼歯から第三臼歯について、頬側の歯根および分岐部中央のセメントエナメル境を指定し、同部位から歯根軸に平行に下ろした垂線上の歯槽骨頂までの距離について三次元的に距離を計測した。

10. 統計処理

実験データは平均値±標準偏差で示した。有意差検定は、統計解析ソフト

GraphPad Prism ver. 9.3 (GraphPad Software、San Diego、California、USA) を用いて、二元配置分散分析（two way ANOVA）を行ったあと、post-hoc として Tukey 検定を行い、$p < 0.05$ を統計学的に有意差があるものとした。

11. 歯周組織への C156S の局所投与

絹糸結紮モデルマウスにおいて絹糸結紮除去時に、250 μg/ml ヒト VEGF-C（Cys156Ser）組換えタンパク（R&D systems、Minneapolis、MN、USA、#752-VC-025、以下 C156S と略す）の投与を行った。投与は上顎口蓋歯肉の左側第二臼歯近心および遠心の 2 箇所に 5 μl マイクロインジェクション（1 匹あたり 2.5 μg）を行った。シリンジは 5 μL Microliter Syringe Model 65 RN（Hamilton、Reno、NV、USA、#7633-01）を使用した。投与および絹糸結紮除去 3 日後に解析した。対照群として、C156S の溶媒である 0.1% Bovine Serum Albumin（Sigma-Aldrich、A4503-100G）含有 PBS のみを投与した。投与後 3 日目のマウスを CO_2 ガスにより安楽死させ、4%PFA を用いて灌流固定し、採取した上顎骨についてマイクロ CT による骨形態解析を行った。

12. 歯肉由来リンパ管内皮細胞の単離

細胞単離酵素はリベラーゼ TM 研究用グレード（Merck、Darmstadt、Germany、#5401119001、以下リベラーゼ TM と略す）、DNAse Type I（Sigma-Aldrich、#DN25-1G）の二種類を混合して使用した。2 %Fetal Bovine Serum（biowest、Nuaillé、France、#S1820-500）含有 PBS（以下単離バッファーと略す）1.0 ml に 13 WU/ml のリベラーゼ TM 88 μl と 100 mg/ml の DNAse Type I 10 μl を混和し酵素液を作製した。CO_2 ガスを用いて安楽死させた *Prox1-tdTomato* マウスから歯肉を剥離し、青函片刃（フェザー、大阪、日本、#FAS-100）を用いて細かくミンスし、単離バッファーに浸漬して氷冷した。低吸着チューブ（住友ベークライト、東京、日本、#MS-90150）にミンスした組織を移し、さらに 1 ml の酵素液を添加した後、恒温振盪器（M・BR-104P、タイテック、埼玉、日本、#0079861-000）を用いて 200 rpm・37 °C にて 20 分間振盪した。続いて 20 μl の UltraPure 0.5M EDTA, pH 8.0（Thermo Fisher Scientific、#15575020）を添加し、再度 200 rpm・37 °C にて 10 分間振盪させた。その後 5 ml の単離バッファーを加えた後、ミニセルストレーナー 70 μm（バイオメディカルサイエンス、東京、日本、BC-AMS-17001）を通して新しい低吸着チュー

ブに移し、細胞懸濁液とした。冷却遠心機（トミー精工、東京、日本、#AX-311）にて 4 °C・1200 rpm・8 分間遠心を行った。上清を丁寧に取り除き、2 ml の単離バッファーで再懸濁を行った。細胞懸濁液をセルストレーナー・キャップ付 5 ml ポリスチレンラウンドチューブ（Corning、Glendale、AZ、USA、#352235）に移し、4 °C・1200 rpm・5 分間遠心を行った。その後上清を取り除き、300 µl の単離バッファーにて再懸濁を行った。最終懸濁液に SYTOX AADvanced Dead Cell Stain（1:100、Thermo Fisher Scientific、#S10309、以下 7-AAD と略す）を加えて、死細胞染色を行った同懸濁液よりセルソーターSH800Z（Sony Biotechnology、San Jose、CA、USA）を用いて、SYTOX 陰性 tdTomato 陽性細胞分画を分取した。

13. 歯肉由来リンパ管内皮細胞の二次元培養

分取した歯肉由来リンパ管内皮細胞は、あらかじめフィブロネクチンコーティングし、培地を添加した培養プレート上に播種した。ヒト由来フィブロネクチン（Sigma-Aldrich、#F2006）1 mg を 1 ml の滅菌水で 1 mg/ml の濃度に調整し、更に調整した原液 100 µl を 10 ml の PBS で 10 µg/ml に希釈し、最終溶液とした。使用するプレートに 10 µg/ml フィブロネクチン溶液を加えて（3 ml/10 cm dish、500 µl/6 well plate、200 µl/12 well plate、50 µl/96 well plate）、30 分以上室温で風乾をしてフィブロネクチンコーティングを完了した。細胞培養培地は基礎培地である EBM-2（Lonza、#CC-3156）と添加因子キットを含んだ EGM-2MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 Bullet Kit（Lonza、Basel、Switzerland、#CC-3202、以下 EGM-2MV と略す）を用いた。添加因子キットにはヒト上皮成長因子、ヒドロコルチゾン、ゲンタマイシン、ウシ胎児血清、血管内皮細胞増殖因子、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子、アルギニン 3 ヒトインスリン様成長因子 1 及びアスコルビン酸が含まれている。培養プレートは事前にフィブロネクチンコーティングを行った。細胞培養条件は 37℃、CO_2 濃度 5.0%、湿潤状態とした。細胞継代時には培地を除去した後、PBS にて洗浄を行い、StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent（Thermo Fisher Scientific、#A1110501）を使用して細胞を剥がし、新たなコーティング済みプレートに播種した。培地交換は 3 日毎に行った。細胞の観察および撮像は位相差顕微鏡 ECLIPSE Ts2（ニコン）にて行った。

14. 歯肉由来リンパ管内皮細胞の三次元培養

歯肉由来リンパ管内皮細胞を 10^6 個 /ml の濃度で EGM-2MV 中に再懸濁後、フィブロネクチン処理を行った μ-slide Angiogenesis（ibidi、Gräfelfing、Germany、#81506）に 0.01ml 播種した。その後 EGM-2MV で 2 倍希釈を行ったマトリゲル（Corning、#356234）を添加して 24 時間 37℃・CO_2 濃度 5.0%にて培養した。

15. 蛍光免疫細胞染色

12 well プレートに丸カバーグラス（松浪硝子、大阪、日本、C018001）を置き、フィブロネクチン処理を行った。その後 PBS で一度洗浄し、1well あたり 2 x 10^4 個の歯肉由来リンパ管内皮細胞を播種した。翌日、細胞が丸カバーグラスに貼り付いていることを確認し、PBS で一度洗浄した後、4 %PFA で室温にて 10 分間固定した。固定後に PBS で 5 分間 3 回洗浄した。ヤギ由来 10 %血清含有 PBS で室温 30 分間ブロッキングを行い、一次抗体ウサギ抗マウス Lyve1 ポリクローナル抗体（1:100、Abcam、Cambridge、UK、#ab14917）で 4℃にて一晩インキュベートした。翌日、PBS で 5 分間 3 回洗浄した。二次抗体 Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1:200、Thermo Fisher Scientific、#A32733）にて、室温で 30 分間インキュベートした。PBS で 5 分間 3 回洗浄した。DAPI を PBS で 1:50,000 に希釈し、室温で 10 分間インキュベートした。PBS で 5 分間 3 回洗浄した。12 well プレートから丸カバーグラスを取り出し、余分な水分を除いた後、封入剤 ProLong Diamond Antifade Mountant（Thermo Fisher Scientific、#P36961）を垂らした新しいスライドガラス上に細胞面が下になるよう置き、観察を行った。

16. 歯肉由来リンパ管内皮細胞の RNA-seq 解析

歯肉由来リンパ管内皮細胞をフィブロネクチン処理した 12well プレートに 1well あたり 2 x 10^4 個播種した。播種翌日に細胞接着を確認後、一度 PBS にて洗浄を行い、血清や抗生物質などの添加因子を含まない EBM-2 を用いて 48 時間培養した。その後、500 ng/ml VEGF-C C156S もしくは PBS を添加した EBM-2 に培地交換し、24 時間後に Maxwell RSC SimlyRNA Cells キット（Promega、WI、USA、#AS1390）を用いて total RNA を回収・精製した。RIN 値測定により RNA の品質を確認後、NEBNext Ultra II Directional RNA library prepkit

（New England Biolabs、Ipswich、MA、USA、#E7760S）を用いてライブラリを作製し、Novaseq6000（Illumina、San Diego、CA、USA）によりシーケンスを行った。得られた配列情報を FastQC、Trimmomatic、HISAT2、Samtools、Stringtie ソフトウェアで解析し、TCC-GUI にて可視化した。q-value < 0.1 を統計学的に有意差があるものとし、Gene Ontology 解析は Metascape[23]にて行った。

結果

1. マウス歯周組織におけるリンパ管の局在と組織修復時の動態

本研究では歯周組織におけるリンパ管の局在を検討するため、リンパ管内皮細胞マーカーである *Prox1* 陽性細胞特異的に赤色蛍光タンパク質を発現する *Prox1-tdTomato* マウスを用いた。まず、正常歯周組織における分布について検討を行うため、血管内皮細胞マーカーである *Tie2* 陽性細胞特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する *Tie2-GFP* マウスを *Prox1-tdTomato* マウスとかけ合わせた *Tie2-GFP; Prox1-tdTomato* ダブルトランスジェニックマウスを作製した（図 1A）。同マウスについて組織学的解析を行ったところ、歯周組織には血管とリンパ管が点在しており（図 1B）、強拡大像の観察により、これまでの報告と一致して [8,9,24]、歯肉結合組織に血管とリンパ管が近接して存在することが確認された（図 1C）。次に、歯周組織の修復過程におけるリンパ管の動態を解析するため、*Prox1-tdTomato* もしくは *Tie2-GFP; Prox1-tdTomato* マウスの上顎左側第二臼歯に絹糸結紮による歯周組織破壊を誘導し、絹糸除去後の歯周組織について経時的に組織学的解析を行った（図 2A）。絹糸除去直後の結紮側においては、歯槽骨吸収や歯間部歯肉の陥凹を認め、非結紮側に比べ、歯間部歯肉のリンパ管の減少を認めた（図 2B-C）。ついで歯周組織修復の後期である結紮除去 7 日目で解析したところ、結紮側において、対照側と同程度の高さまで骨組織が修復されているが、その上部に新生した肉芽組織が観察された（図 2D）。同部を強拡大で観察したところ、修復された骨組織の上部の肉芽組織に多くの血管およびリンパ管が観察された（図 2E）。すなわち、組織修復後期においては血管だけでなく、リンパ管も増生することが示唆された。

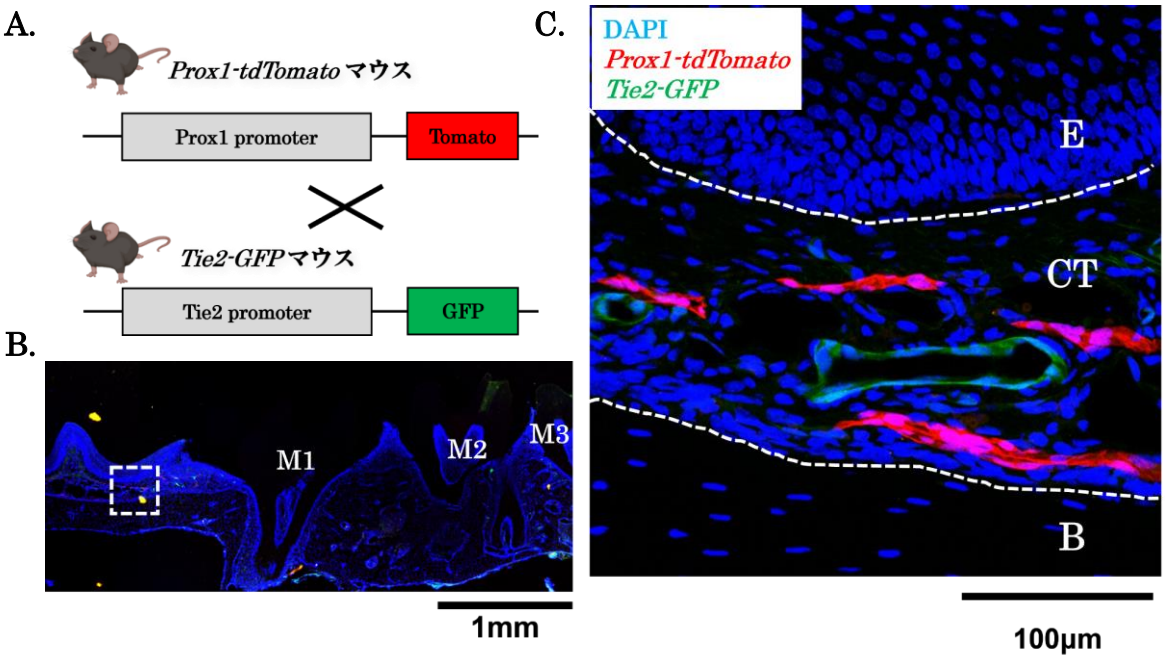
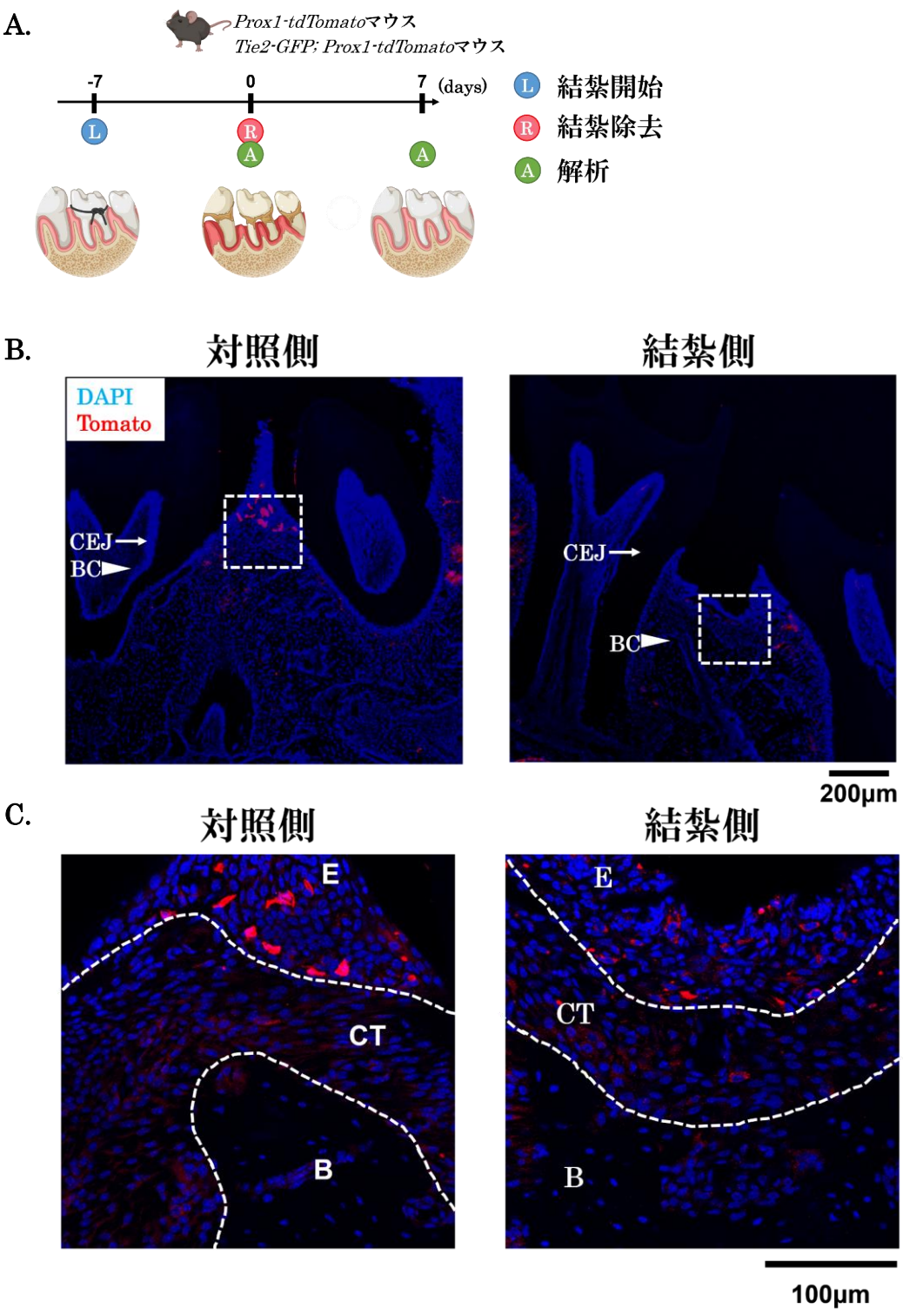


図 1. 正常歯周組織におけるリンパ管の分布の検討

A. 使用した *Prox1-tdTomato* マウス、*Tie2-GFP* マウスおよび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示す。

B. *Tie2-GFP; Prox1-tdTomato* マウス上顎歯周組織における DAPI で核染色を行った蛍光観察像を示す。観察は 4 倍で行った。光学顕微鏡 ECLIPSE Ti を用いて画像を取得した。M1: 第一臼歯、M2: 第二臼歯、M3: 第三臼歯

C. 図 B.四角部分の強拡大像を示す。歯肉上皮下結合組織部に血管とリンパ管の走行が観察された。共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8 を用いて画像を取得した。E: 歯肉上皮、CT: 歯肉結合組織、B: 歯槽骨


A.
Prox1-tdTomatoマウス
Tie2-GFP; Prox1-tdTomatoマウス
-7
0
7 (days)
L
R
A
A
結紮開始
結紮除去
解析
B.
対照側
結紮側
DAPI
Tomato
CEJ
BC
CEJ
BC
200μm
C.
対照側
結紮側
E
CT
B
E
CT
B
100μm

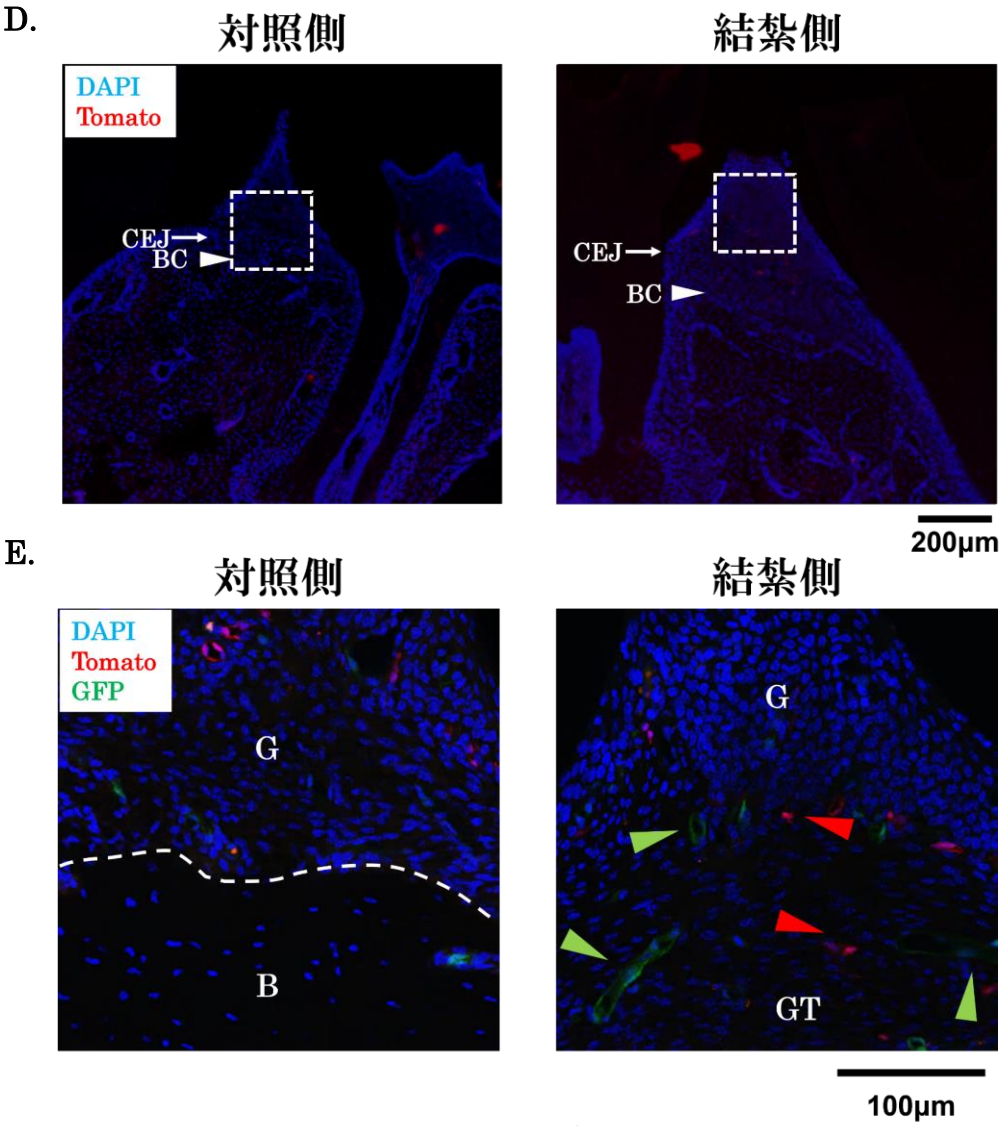


図 2.　歯周組織修復過程におけるリンパ管の局在

A. 歯周組織修復過程の実験プロトコールを示す。

B. 結紮除去時における対照側および絹糸結紮側の組織切片の蛍光顕微鏡像を示す。核染色は DAPI(1:50000)、共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8 を用いて画像を取得した。CEJ: セメントエナメル境、BC: 歯槽骨頂

C. 図 B.四角部分の拡大図を示す。結紮側ではリンパ管が減少している様子が観察された。E: 歯肉上皮、CT: 歯肉結合組織、B: 歯槽骨

D. 結紮除去 7 日目における対照側および絹糸結紮側の組織切片の蛍光顕微鏡像を示す。核染色は DAPI(1:50000)、共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8 を用いて画像を取得した。CEJ: セメントエナメル境、BC: 歯槽骨頂

E. 図 D.四角部分の拡大図を示す。結紮側について歯肉下の肉芽組織部分にリンパ管の増加が観察された。G: 歯肉、GT: 肉芽組織、B: 歯槽骨、緑矢頭: 血管、赤矢頭: リンパ管

2. 組織透明化手法の歯周組織への応用

Tie2-GFP; Prox1-tdTomato マウスを用いた歯周組織のリンパ管解析を目的として、共焦点顕微鏡観察を行ったところ、Z 軸方向に数 μm 観察深度が異なると、血管およびリンパ管の管腔構造は異なって観察された（図 3A)。すなわち、脈管神経系ネットワークに代表されるような組織内の細胞間の連携や相互作用を、連続性を持って観察することは従来の組織切片を用いた観察法では困難であることが確認された。そこで、歯周組織のリンパ管の解析について、組織を透明化し、浅部から深部まで連続的に観察する手法の応用を検討した。

まず歯と骨を含む歯周組織の解析には必須の、脱灰試薬に関する検討を行った。モールス液、EDTA、CUBIC-B の各脱灰試薬中で振盪した上顎骨について、経時的に μCT 撮影を行い（図 3B)、得られた平均 CT 値を検討したところ、モールス液が最も迅速に脱灰でき、毎日交換の EDTA での脱灰がそれに続いた（図 3C)。さらにこれらの 2 つについて蛍光褪色の評価を行ったところモールス液での脱灰では GFP シグナルの著しい低下を認めた一方で、EDTA での脱灰では当初の蛍光シグナルを維持していた（図 3D)。以上の結果より、比較的迅速に脱灰処理を行うことができ、蛍光褪色が少ない EDTA を使用した脱灰を行うこととした。

続いて透明化試薬の比較を行った。各固定・脱灰済みの上顎骨について SeeDB2 法、ScaleS 法、CUBIC 法の各プロトコル通り（図 4A）に透明化処理した後、格子線上で実体顕微鏡にて試料を撮影し、背景の格子線が確認できるか定性的に検討した。その結果、透明化処理を行わない上顎骨と比べて、すべての透明化手法で格子線が確認できたが、特に CUBIC 処理によりほぼ完全な透明度を得られることが明らかとなった。（図 4B）

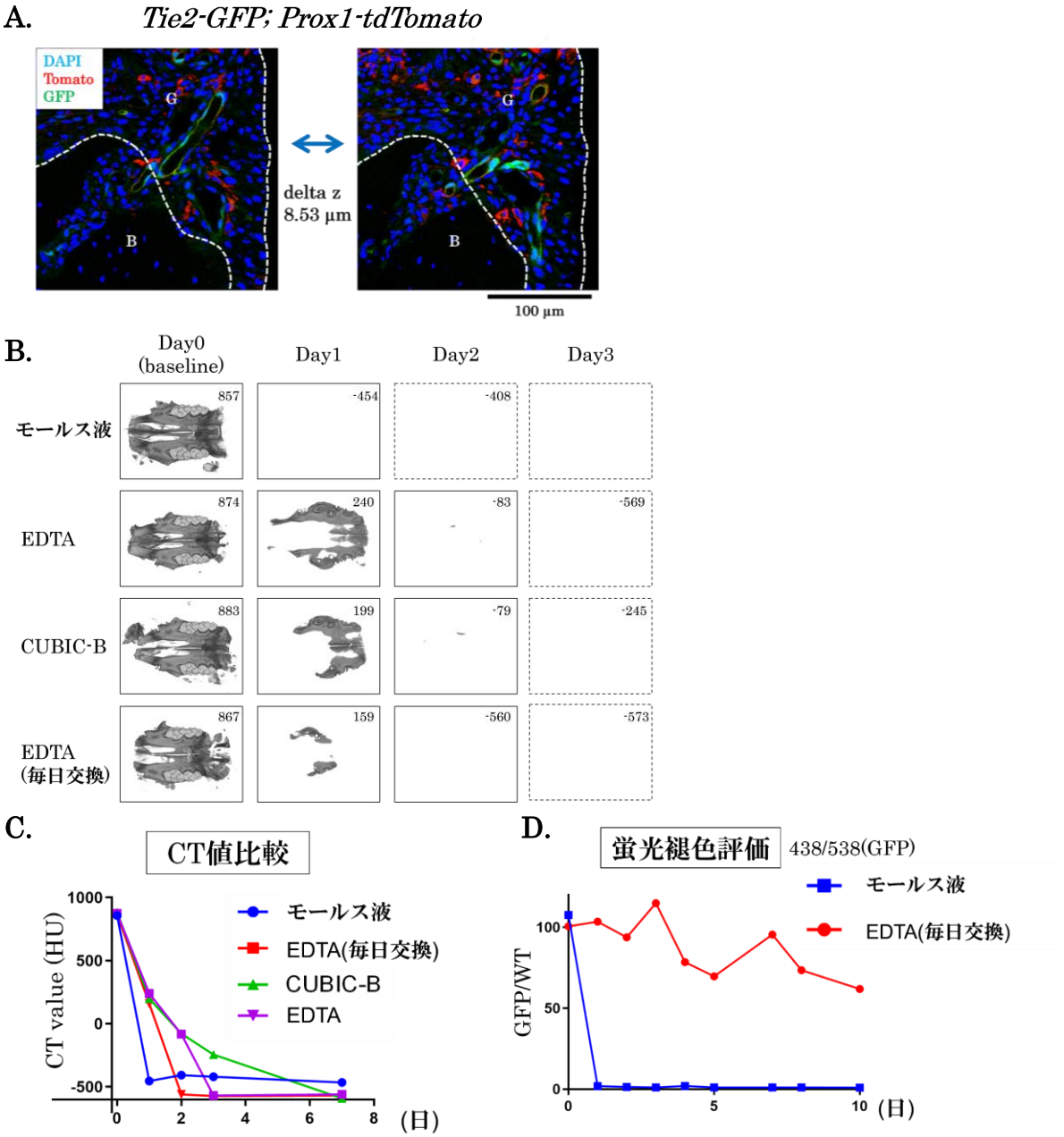


図 3.　透明化手法の歯周組織への応用の検討

A. マウス歯肉における脈管系の観察。Z 軸方向に 8.53µm 離れた 2 枚の切片上で、異なる脈管の走行が観察された。各サンプルの枠内の右上に CT 値を示す。G: 歯肉、B: 歯槽骨

B. 各脱灰試薬を用いたそれぞれの脱灰過程での µCT 像を示す。実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2 を用いて画像を取得した。

C. µCT 撮影で得られた CT 値の比較を示す。モールス液での脱灰が最も迅速で、毎日液交換した EDTA での脱灰がそれに続いた。

D. 蛍光プレートリーダーを用いて EDTA とモールス液処理による蛍光褪色の評価を行った。モールス液での脱灰では褪色が著しい一方で、EDTA での脱灰では大きく変化はなかった。

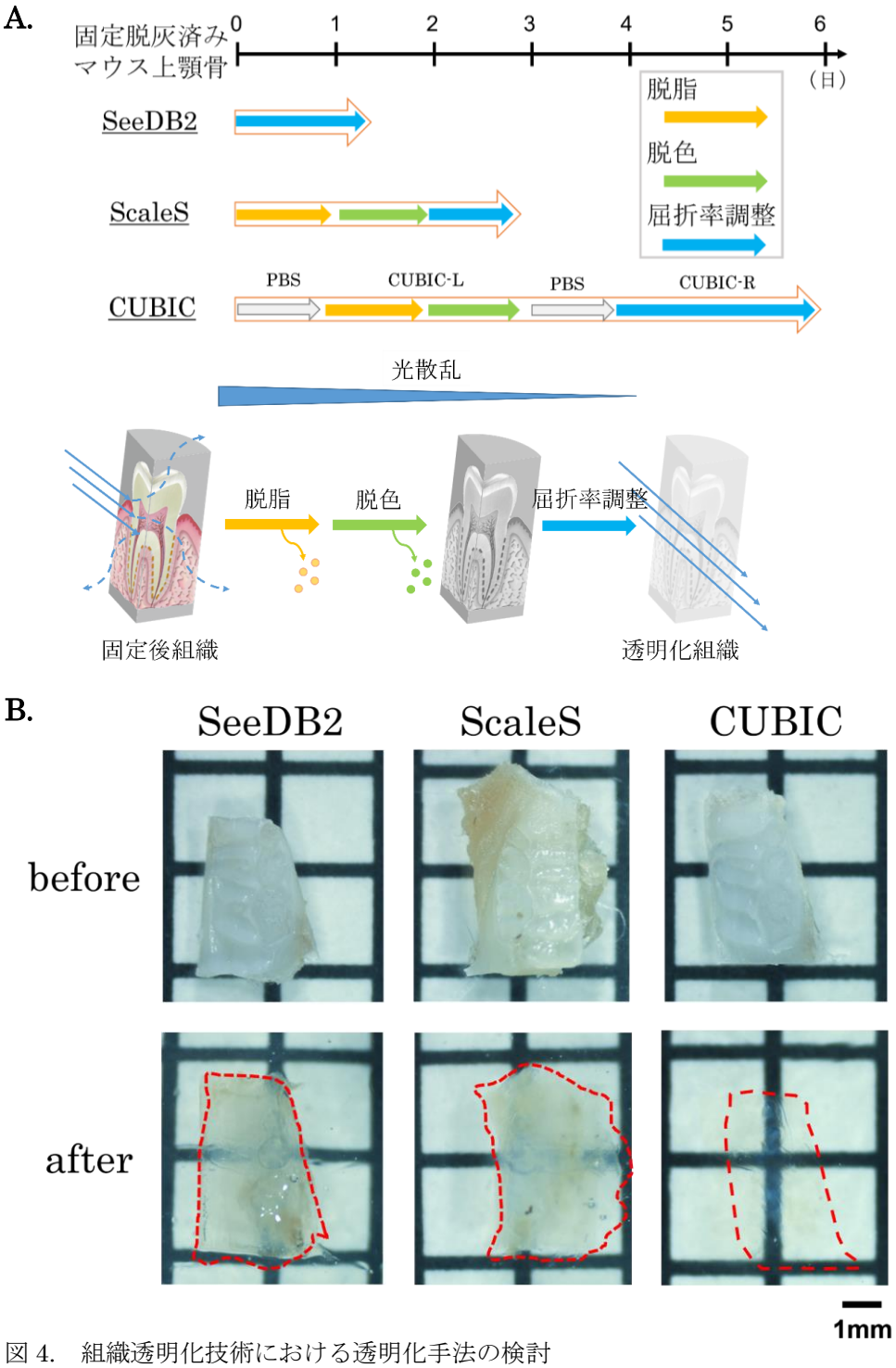


図 4.　組織透明化技術における透明化手法の検討

A. 透明化処理の仕組みとタイムコースを示す。

B. 組織透明化処理前後の実体顕微鏡での組織像を示す。上段は透明化前、下段は透明化処理後の結果を示す。左より SeeDB2 法、ScaleS 法、CUBIC 法で透明化を行った。下段の赤点線は透明化処理後の組織の外形を示す。CUBIC 法での透明化によって最も高い透明度が得られた。実体顕微鏡 Leica S6D を用いて画像を取得した。

3. 透明化歯周組織の観察

EDTA により脱灰し、CUBIC 法にて透明化処理した上顎骨について、三次元観察を行った。Propidium Iodide にて核染色を行ったマウス上顎骨のライトシート顕微鏡観察結果より、歯周組織全体の撮像が 3-5 分で完了し、歯周組織の細胞分布が明瞭に観察可能であった（図 5A)。さらに、同三次元構築像は様々な断面を観察可能であり、従来 2 つの組織を採取し、それぞれ切片作成しなければならなかった矢状断、水平断に関しても一度に観察が可能となった（図 5B)。さらに強拡大像では、1 つ 1 つの核が明瞭に識別できる解像度で観察でき、一つの歯根膜から歯槽骨内部を通って別の根の歯根膜へと走行するような脈管ネットワークも確認された（図 5C)。以上より、組織透明化技術とライトシート顕微鏡観察技術を組み合わせることで、歯周組織全体の構成を一細胞の解像度で観察可能となった。

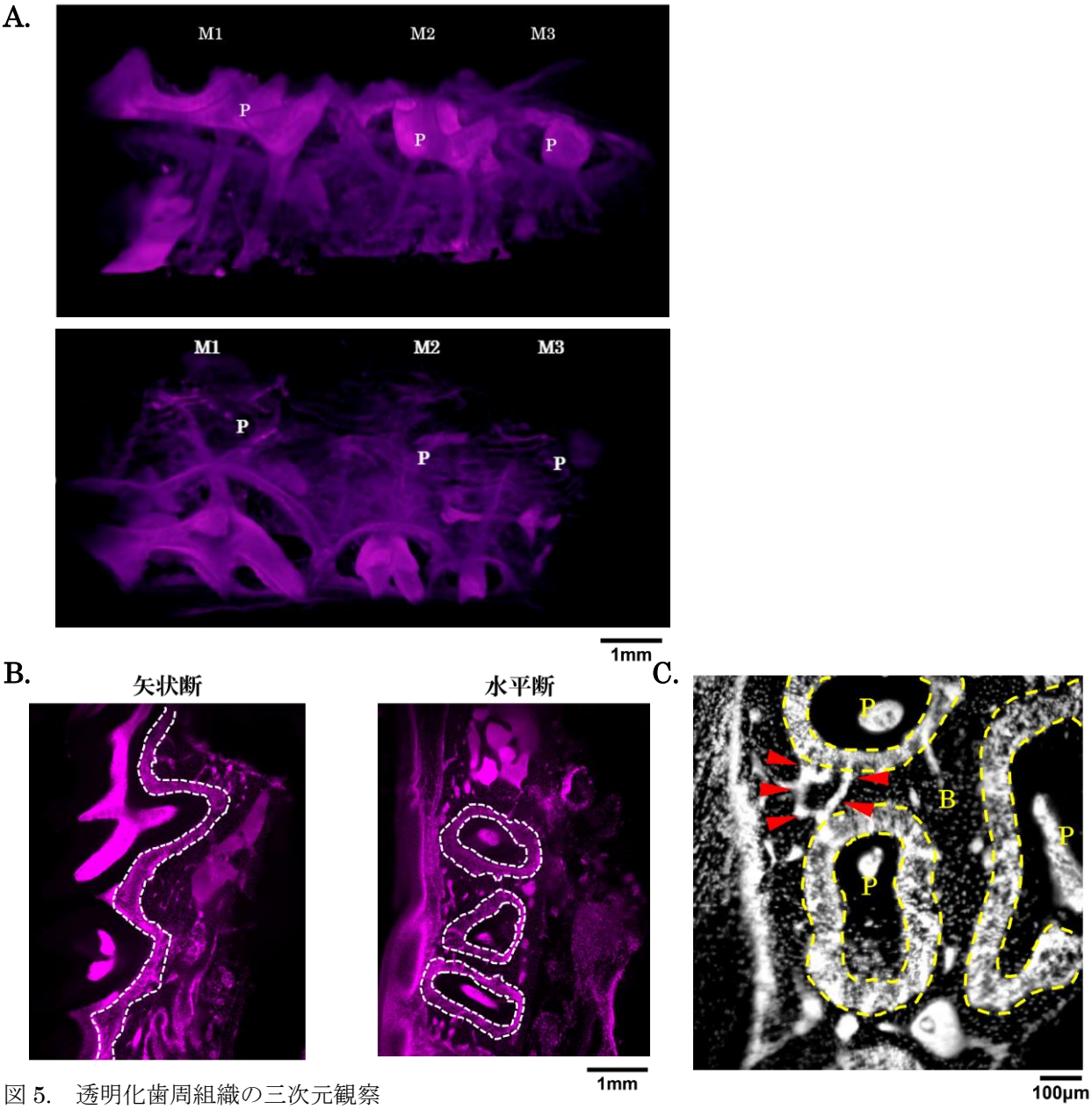


図 5.　透明化歯周組織の三次元観察

A.　CUBIC 法にて透明化処理を行った歯周組織をライトシート顕微鏡で撮像を行った。上段画像のように三次元での撮像を行うことができる。下段画像は上段画像の位置から 180 ° 回転させた撮像を示す。臼歯 3 本の明瞭な歯髄が観察される。ライトシート顕微鏡 LightSheet7 を用いて画像を取得した。P: 歯髄、M1:第一臼歯、M2:第二臼歯、M3:第三臼歯

B.　図 A.の画像を矢状断、水平断にてそれぞれ観察を行った。破線部で囲まれた部分は歯根膜を示す。ライトシート顕微鏡 LightSheet7 を用いて画像を取得した。

C.　水平断で観察した歯根周囲の拡大像を示す。歯根膜から別の歯根の歯根膜へと脈管の走行が観察された。ライトシート顕微鏡 LightSheet7 を用いて画像を取得した。矢頭: 歯槽骨内を走行する脈管、P: 歯髄、B: 歯槽骨

4. マウス歯肉リンパ管ネットワークの観察

確立した透明化歯周組織のライトシート顕微鏡観察手法を歯肉リンパ管ネットワークの観察に応用した。*Prox1-tdTomato* マウスの上顎左側第二臼歯に絹糸結紮による歯周組織破壊を誘導し、絹糸除去後 3 日目の歯周組織について示したタイムコースで（図 6A)、歯肉組織を一塊として剥離後（図 6B)、透明化処理を行い歯肉全体のリンパ管のライトシート顕微鏡観察を行った。興味深いことに、非結紮側においても、歯の周囲から口蓋歯肉へ向かってリンパ管が恒常的にネットワークを形成しているのが観察された。さらに、組織修復中過程にある歯肉においては、臼歯の辺縁歯肉において、結紮側により密なリンパ管形成が観察された（図 6C)。それぞれの辺縁歯肉について強拡大にて観察を行うと、非結紮側に比べて、結紮側において、辺縁歯肉を中心により密なリンパ管ネットワークを形成していることが明らかとなった（図 6D)。これらの結果よりリンパ管は組織修復中に増生し、創傷治癒過程に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

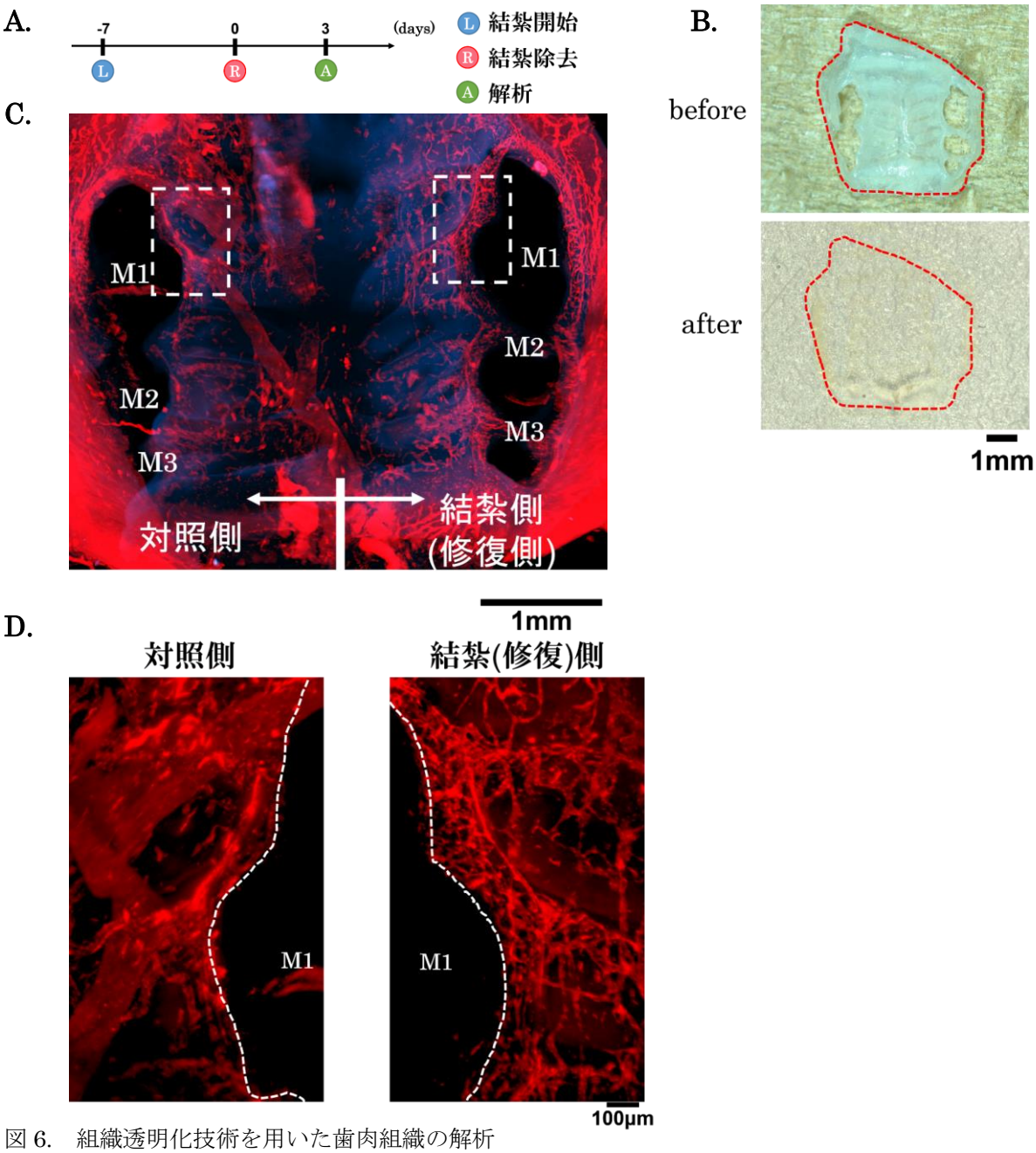


図 6.　組織透明化技術を用いた歯肉組織の解析

A. 絹糸結紮モデルマウス解析のタイムコースを示す。

B. *Prox1-tdTomato* マウス歯肉の透明化処理前後を示す。上段が透明化処理前、下段が透明化処理後を示す。実体顕微鏡 Leica S6D を用いて画像を取得した。

C. *Prox1-tdTomato* マウス歯肉の透明化処理後のライトシート顕微鏡による 3 次元構築像を示す。左側は対照側、右側は修復側を示す。ライトシート顕微鏡 Lightsheet7 を用いて画像を取得した。青色は核染色像を示す。M1: 第一臼歯、M2: 第二臼歯、M3: 第三臼歯

D.　図 C.四角部分の拡大図を示す。対照側に比べて結紮側のリンパ管ネットワークが密になっていることが観察された。M1:第一臼歯

5. リンパ管の誘導メカニズムの検討

組織修復部へのリンパ管の誘導メカニズムを検討するため、リンパ管を誘導する主なサイトカインである *Vegfc* 発現細胞の局在を蛍光 RNA *in situ* hybridization を用いて検討した。その結果、*Vegfc* mRNA は歯肉上皮に主に局在し、非結紮側と比べて結紮側においてその発現が増強していた（図 7A）。すなわち、組織修復時におけるリンパ管ネットワークの構築は、歯肉上皮由来の *Vegfc* によって誘導されることが示唆された。

次いで組織修復時に外因性にリンパ管新生因子を投与することで、組織修復が促進されるか検討を行った。リンパ管増生の主なシグナルである *VEGFR-3* にのみ選択的に作用する 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 解析を行った。μCT 三次元構築像より、VEGF-C C156S および PBS 投与群のいずれにおいても非結紮側と比べて結紮側において歯槽骨吸収を認めた（図 7B）。さらに An らの方法 [25]にしたがって、頬側のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を 3 点もしくは 8 点について三次元的に計測し統計解析を行ったところ、いずれの定量方法においても、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（図 7C）。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。

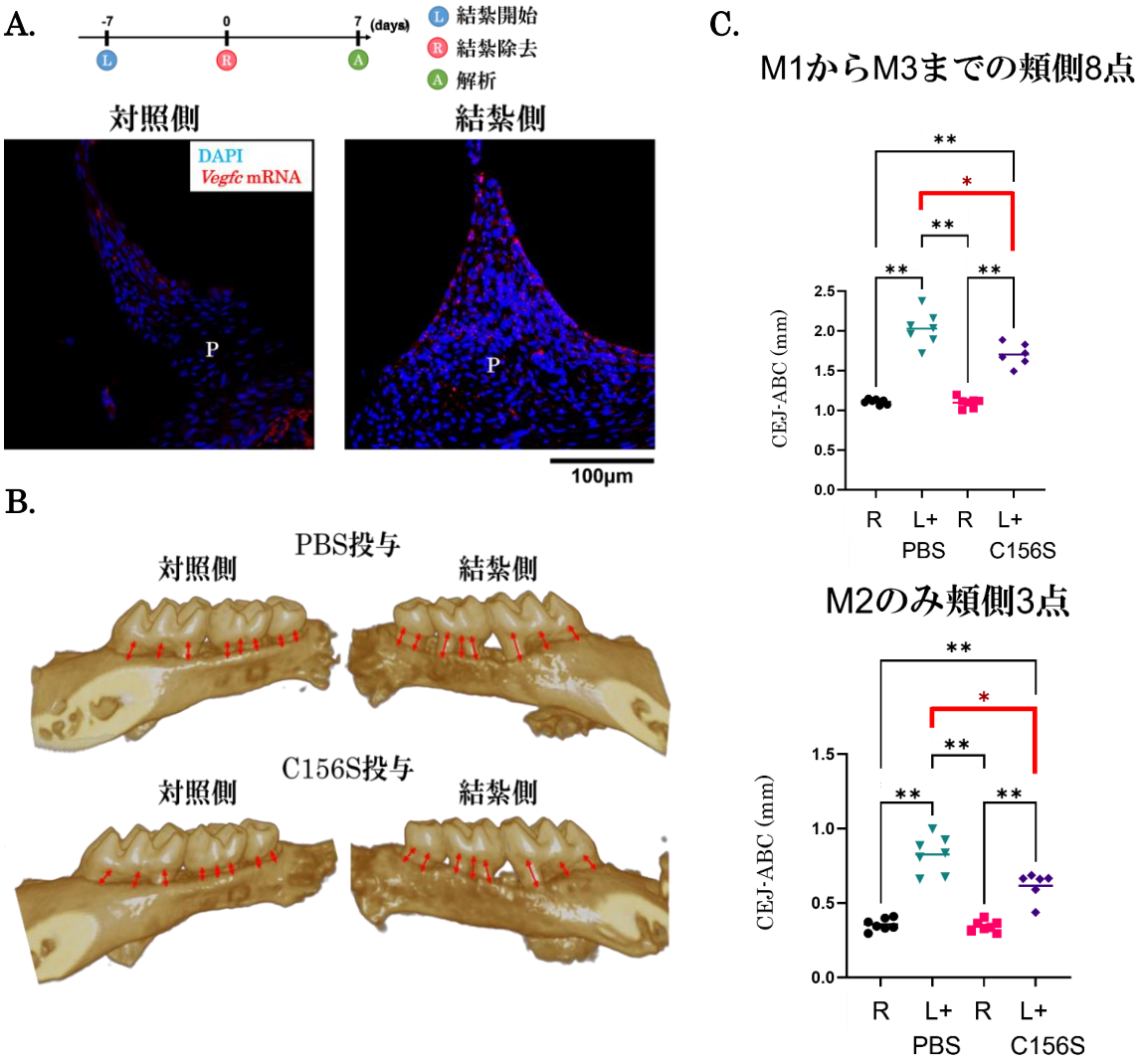


図 7.リンパ管の誘導メカニズムの検討

A. 結紮除去 3 日目の歯間乳頭部歯肉における *Vegfc* 発現について RNAscope *in situ* hybridization での結果を示す。結紮側において歯肉上皮に *Vegfc* 発現が増強している様子が観察された。共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8 を用いて画像を取得した。P: 歯間乳頭部歯肉

B. 結紮除去後 3 日目において、マイクロインジェクションにより PBS あるいは C156S を投与したマウスについて歯および歯槽骨の代表的な μCT 三次元構築像を示す。頬側の歯根および分岐部中央のセメントエナメル境を指定し、同部位から歯根軸に平行に下ろした垂線上の歯槽骨頂までの距離について三次元的に距離を計測した（赤両矢印で示す）。実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2 を用いて画像を取得した。

C. M1 から M3 の 8 点および M2 のみの 3 点のセメントエナメル境–歯槽骨頂間の距離の総和についての定量結果を示す。n=6-7 mice、Tukey's 多重比較検定、*p<0.001, **p<0.0001

6. 歯肉由来リンパ管内皮細胞の単離と初代培養

リンパ管を介した組織修復促進メカニズムを検討するため、*Prox1-tdTomato* マウスより採取した歯肉から酵素処理により細胞懸濁液を調整し、7-AAD 陰性 tdTomato 陽性細胞をセルソーターにて分取（図 8A）し、得られた細胞の初代培養を行った（図 8B）。同細胞は継代培養後も tdTomato 陽性であり、リンパ管マーカーである Lyve-1 タンパク質の発現を認めた（図 8C）。さらに同細胞をゲル内にて培養すると細胞どうしが連結し、枝分かれした管状構造を形成した（図 8D）。以上の解析により、初代培養細胞がリンパ管内皮細胞であることが確認された。

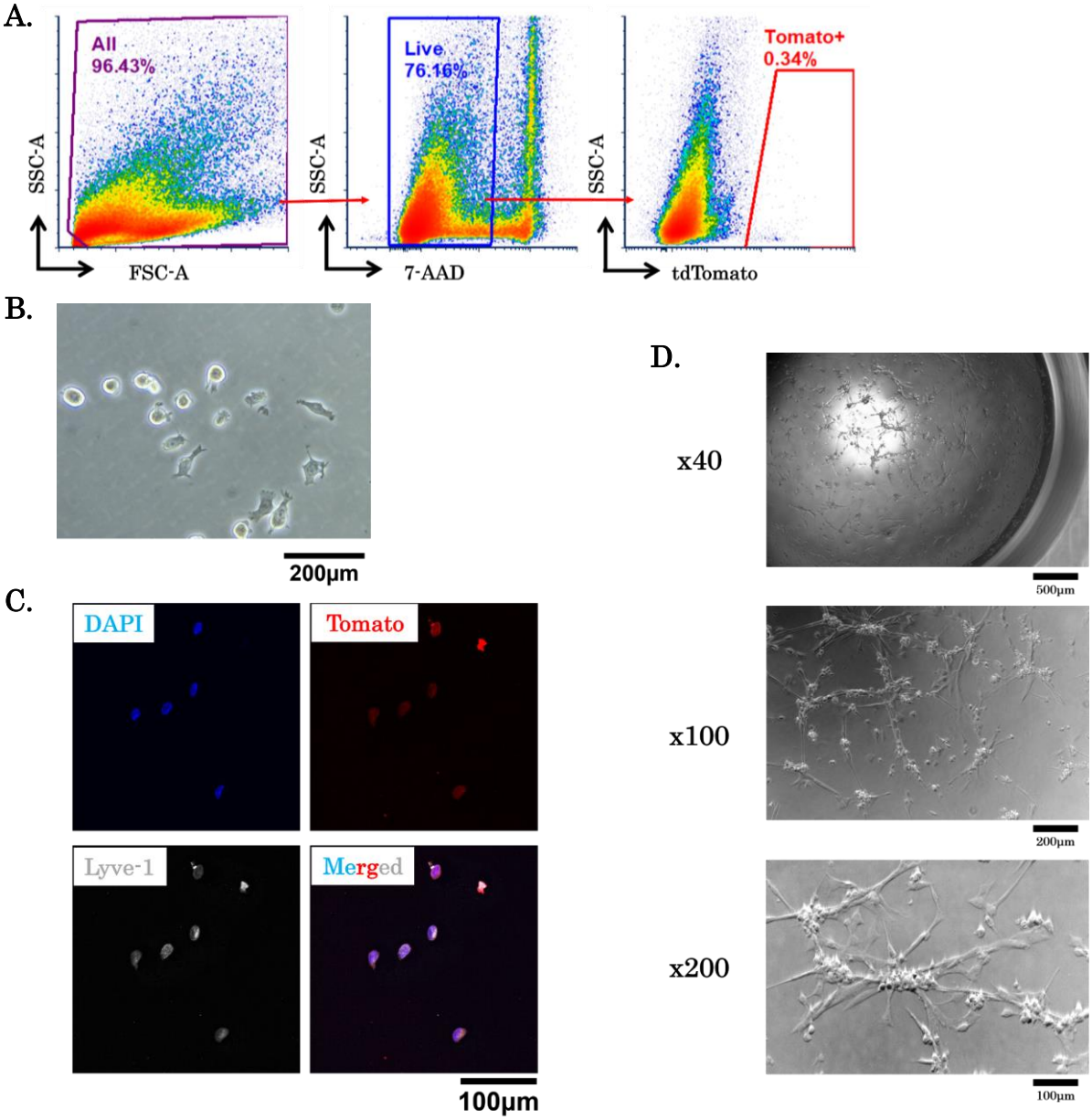


図 8. *Prox1-tdTomato* 細胞の単離および培養

A. *Prox1-tdTomato* マウス歯肉より調製した細胞懸濁液からセルソーターを用いて 7-AAD 陰性 tdTomato 陽性分画を分取した際の代表的な density plot を示す。

B. 図 A で得られた細胞の培養開始後 10 日目の観察像を示す。位相差顕微鏡 ECLIPSE Ts2 を用いて画像を取得した。

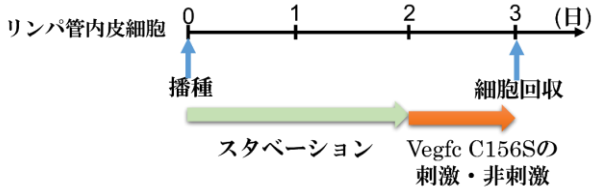
C. 培養を開始した *Prox1-tdTomato* 細胞に対して Lyve-1 抗体を用いた細胞蛍光免疫染色像を示す。培養細胞が Lyve-1 を発現していることが示された。光学顕微鏡 ECLIPSE Ti を用いて画像を取得した。

D. tdTomato 陽性細胞の 3 次元培養の結果を示す。管状構造が確認された。位相差顕微鏡 ECLIPSE Ts2 を用いて画像を取得した。

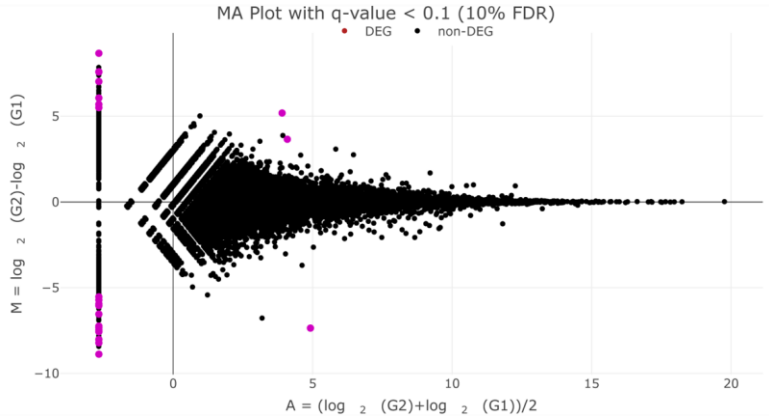
7. 単離歯肉由来リンパ管内皮細胞の RNA-seq 解析

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（図 9A-B)。VEGF-C C156S 群で発現が統計学的に有意に変動（q 値＜0.1）する遺伝子を 20 個同定した（図 9C)。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遺伝子群の発現を変動させることを認めた（図 9D)。

A.



B.



C.

VEGFC C156S刺激により発現が増加した遺伝子

Gene name	Log2(FC)	q-value
Siah1b	7.357	0.000
Rasl10a	7.568	0.000
5830405F06Rik	6.043	0.000
Rpl36-ps12	5.783	0.002
Cxcr3	5.950	0.005
Ing2	5.719	0.005
Slc28a1	5.587	0.008
Rnf183	6.540	0.017
Hspa12b	8.219	0.019
Scn1a	5.719	0.027
Tmem202	8.018	0.028
Serpina12	5.531	0.070

VEGFC C156S刺激により発現が減少した遺伝子

Gene name	Log2(FC)	q-value
Kank4os	-7.026	0.000
Slc25a27	-5.691	0.001
Cenps	-3.657	0.002
Fam76a	-5.503	0.003
Lonp1	-7.597	0.031
Ell3	-7.595	0.036
1600010M07Rik	-7.580	0.036
Tmem234	-5.188	0.064

D.

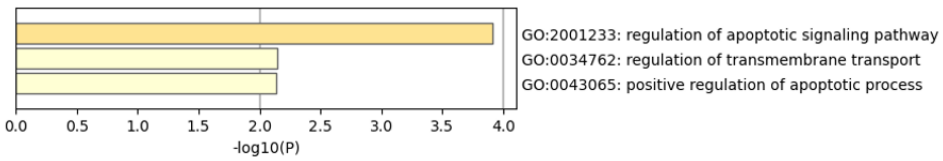


図 9.　単離歯肉由来リンパ管内皮細胞の RNA-seq 解析

A. リンパ管内皮細胞の刺激条件を示す。

B. RNA-seq 解析結果の MA プロットを示す。横軸に log2 変換されたシグナル値の平均値、縦軸に log2 変換されたシグナル値の差を示す。q-value<0.1 の遺伝子を発現が有意に変動するものとし、20 個を赤色で示す。

C. 発現が有意に変動する遺伝子 20 個を示す。

D. 発現が有意に変動する遺伝子 20 個の Gene Ontology 解析結果を示す。

考察

歯周組織においてリンパ管は主に歯肉固有層に存在し、リンパ管内皮細胞の単層からなる薄肉で比較的大きな脈管として存在する。血管とは異なり、周皮細胞や平滑筋細胞に覆われておらず、基底膜もほとんどないため、リンパ管内皮細胞間の間隙を組織液が通過する。歯周組織においても組織液の恒常性維持にリンパ管は主要な役割を担っていることが知られている[12)]。

一方で、歯と歯肉の境界部に付着した細菌バイオフィルムにより歯周組織に炎症反応が惹起されると、血管の透過性が亢進し、免疫担当細胞とともに組織液が間質に流入し、組織の腫脹を引き起こす[26)]。リンパ管は組織液を血液循環に還流することに加えて、免疫担当細胞を運搬し、同細胞はリンパ節にて抗原提示等を行うこととなる[27)]。さらにリンパ管は組織液や免疫細胞の受動的な導管として機能するのみならず、樹状細胞上のケモカイン受容体 CCR7 とリンパ管内皮細胞上の CCL21 との相互作用を介して、樹状細胞の炎症部位への能動的遊走に関与しているとも報告[28)]されている。

本研究では、歯周組織の平常時・損傷時・修復時のリンパ管の動態を、*Prox1-tdTomato* マウスに絹糸結紮モデルを作製することにより解析した。その結果、組織損傷時にリンパ管も損傷を受け、一時的にその局在を減少させた（図 2B-C）が、組織修復時には対照側以上にリンパ管が増加していることが明らかとなった（図 2D-E）。これまでに絹糸結紮モデルや *Porphyromonas gingivalis* 経口投与モデルを用いて歯周組織が損傷を受けた際のリンパ管の動態が検討されてきたが、本研究結果より、組織修復時においてもリンパ管が重要な役割を担っていることが示唆された。歯周組織修復におけるリンパ管の役割についてはこれまで報告がなく、その詳細な機序については今後の検討課題として残されている。リンパ管による間接的な免疫制御や抗炎症作用が考えられる一方で、心臓の組織再生においては、リンパ管由来生理活性物質（lymphoangiocrine）のうち、特に RELN が心筋細胞の増殖と生存を制御することにより、リンパ管内皮細胞が能動的に同組織の修復を担っていることが報告[5)]されていることから、組織修復時の歯周組織リンパ管が発現する分泌因子についても今後着目する必要があると考えられる。

また、修復中の歯肉組織においてリンパ管の増生を認めた（図 6C-D）が、既存のリンパ管から新しいリンパ管が形成された（lymphangiogenesis）のか、前

駆細胞から分化したのか(lymphvasculogenesis)については解明されていない。正常時においても密なリンパ管ネットワークを認める（図 6C-D）ことから、lymphangiogenesis の貢献が大きいと考えられるが、*Nestin* 陽性間葉系前駆細胞がリンパ管に分化することも報告[29]されており、歯周組織修復時に様々な細胞群がどのように機能して修復していくかの詳細を検討することは、今後の重要な課題である。

最近になって、リンパ管はその起源及びシグナル伝達経路に臓器特異性を持つことが明らかとなってきている[30,31]。頸部および胸部の皮膚リンパ節のリンパ管内皮細胞は、他のほとんどのリンパ管内皮細胞と同様に、*Tie2* 陽性細胞系譜の静脈内皮細胞の分化転換を起源とするが、腰部の皮膚リンパ節のリンパ管内皮細胞の多くは *Tie2* 陽性細胞系譜ではないことが示されている[32]。さらに VEGFR-3 シグナルはすべてのリンパ管内皮細胞発生に共通に必須の分子であるが、その下流のシグナル伝達経路については臓器特異的な相違点が存在する。例えば、VEGFR-3 シグナルの下流の PI3K p110α サブユニットを阻害したマウスでは、腸間膜のリンパ管の発生が影響を受けたのに対して、皮膚のリンパ管は正常に発生したことが報告されている[33]。歯周組織におけるリンパ管の起源やシグナル経路の詳細についてはまだ十分に検討されておらず、本研究で樹立した歯肉リンパ管内皮細胞（図 8A）の解析や、*Tie2* 陽性細胞の歯周組織における細胞系譜解析を行うことにより今後明らかにされるものと期待される。

歯周組織の修復過程における組織学的解析により、歯肉上皮の *Vegfc* 発現が亢進することが、本研究により明らかとなった（図 7A）。*Vegfc* を発現する細胞は上皮細胞以外にも、血小板、マクロファージ、線維芽細胞など多くの報告[34]がなされており、歯周組織においても、これらの細胞もリンパ管の誘導を担っている可能性が考えられる。組織修復過程において *Vegfc* が誘導される機序は不明であるが、他組織における報告では、低酸素や炎症性サイトカイン[35]によってその発現が誘導され、その転写制御はホメオボックスタンパク質 Hhex[36]が担っているという報告がなされている。今後、歯肉上皮細胞や血小板、マクロファージ、線維芽細胞がどのようにリンパ管を誘導し、歯周組織を修復していくかの機序の検討が必要であると考える。

本研究では、VEGF-C C156S の局所投与により、絹糸結紮除去後の歯槽骨の修復が促進されることが明らかとなった（図 7B-C）。血管内皮細胞増殖因子受容体 1（VEGFR-1）および血管内皮細胞増殖因子受容体 2（VEGFR-2）は血管

内皮細胞に、VEGFR-3 はリンパ管内皮細胞に特異的に発現している一方で、VEGF-C は VEGFR-3 のみならず、VEGFR-2 にも高い親和性を有する。VEGF-C C156S は VEGFR-2 への結合能がなく、VEGFR-3 シグナルを特異的に活性化可能であり、VEGF-C C156S 投与により血管の増生を起こさずリンパ管のみ増生することが確認されている[7,37]。また、VEGF-C C156S 投与はリンパ浮腫の改善[37]、皮膚の慢性炎症の改善[38]、膠芽腫の免疫回避防止[39]、などの効果がすでに示されており、歯周組織再生を活性化できる候補分子の一つとして、今後の検討が期待される。

興味深いことに、腱組織において *Col2a1* 陽性間葉系前駆細胞特異的に線維芽細胞増殖因子受容体 3（FGFR-3）をノックアウトすることにより、同細胞が軟骨細胞や骨芽細胞ではなくリンパ管内皮細胞に分化するとともに、リンパ管内皮細胞中の FGFR-3 をノックアウトすることによりリンパ管内皮細胞が減少し、異所性骨化症を促進させたとの報告がなされている[40]。このことは、骨形成の過程にもおいてリンパ管が局所のリンパ液排泄や炎症制御を介して関与していることを示唆しており、歯周組織におけるセメント質・歯槽骨といった硬組織の恒常性維持や修復・再生過程にリンパ管による局所環境の調節機構がどのように関与しているのかについては重要な検討課題として残されている。

リンパ管は臓器特異的に加齢に伴う変化を認めると報告されている。例えば、高齢マウスの皮膚、気管、横隔膜においては若齢マウスと形態変化を認めなかったのに対して、髄膜においてはリンパ管内皮細胞の接合部に形態変化を認め、アルツハイマー病や加齢に伴う認知機能低下に関与していることが示唆されている[41,42]。歯周組織におけるリンパ管の加齢変化についてはほとんど報告がなく、加齢による歯周組織のリンパ管の変化を検討することは、高齢者において歯周病に対する感受性が亢進するメカニズムを理解する一助になるものと期待される。

また、歯周病は様々な全身疾患との関連が示唆されている。歯周病と腸炎の関連についての最近の報告においては、絹糸結紮モデルにより歯周炎を惹起させた上で、歯周組織の所属リンパ節である顎下リンパ節に集積したリンパ球を光遺伝学の手法で蛍光標識したところ、腸炎病変部に同標識リンパ球が集積することが明らかとなっている[43]。すなわち、口-腸管関連において、細菌を介した直接的な経路以外に、免疫担当細胞を介した間接的な経路も重要であると考えられる。一方で、口腔領域以外で炎症を起こした場合については、上記のような

経路があるのか否かについて報告はなく、歯周組織からのリンパ球遊走メカニズムに組織特異性がある可能性が示唆される。本研究により、歯周組織におけるリンパ管ネットワークとその創傷応答が三次元的に初めて可視化され、組織損傷によってさらにネットワークが増強されることが示された（図 6C-D)。今後歯周組織のリンパ管に関する機能やリンパ球との相互作用の解析が進めば、歯周病と全身疾患の関連メカニズムの新たな詳細が明らかになるものと期待される。

本研究では、蛍光レポーターマウス・組織透明化・ライトシート顕微鏡撮影の 3 つを組み合わせて、歯周組織の三次元観察を実現した（図 5A-C)。矢状断、水平断においても一度の撮影から歪みのない画像データを得ることが可能となり、より正確に歯周組織構成細胞の三次元的な位置関係を検討できるようになった（図 5B)。歯周組織での透明化技術の応用においては、組織固定後の脱灰操作による蛍光褪色が課題であった。本研究では脱灰の迅速さと組織における蛍光強度への影響について検討し、EDTA を毎日交換することにより比較的迅速かつ蛍光褪色が少ない透明化処理が可能となった（図 3B-D)。組織透明化技術はこれまでマウスの全脳や全身の透明化などに主に利用されてきたが、マウス以外の生物種についての応用も近年報告されている。ゼブラフィッシュのような小さな生物種[44]からヒトの脳ブロックサンプル[45]など様々な大きさの試料に透明化技術が応用されている。さらにこの技術を腫瘍の病理診断に用いようとする試みもすでになされており[46]、組織の染色が必要であるものの、口腔領域にも同技術は応用可能と考えられる。例えば、歯肉増殖症患者に歯肉切除術を行った際に、同切除歯肉の脈管を蛍光色素で染色後、透明化処理を行い、三次元観察をすることで、脈管ネットワークの密度や浮腫性もしくは線維性病変であるか等、通常の病理組織切片を用いた場合とは異なる診断が行える可能性が挙げられる。

これまでに様々な組織透明化技術が開発されているが、本研究で使用した CUBIC 法による透明化は脱灰した歯周組織においても非常に高い透明度が得られた（図 4B)。CUBIC 法は脱脂、脱色、屈折率調整の各段階（図 4A）について、1600 種類以上の化合物スクリーニングを行い、適した試薬を同定しており、特に脱色については血液中のヘムの脱色度を指標に試薬を選択している。このため、特に脈管に富んだ歯周組織においては他の手法に比べて高い透明度が得られたと考えられる。一方で、CUBIC 法を用いて透明化した脳組織の神経細

胞シナプス部における電子顕微鏡解析により、ScaleS 法を用いて透明化した場合には観察可能であった超微細構造が保持されていない [15]ことが示されている。今後さらなる微細構造の解析をライトシート顕微鏡観察に組み合わせて行う場合には、他の手法の応用を検討する必要があると考えられる。さらに、CUBIC 法は他の手法と比べて処理時間を要する（図 4A）ため、組織の蛍光褪色が進みやすいと考えられる。弱蛍光のサンプルについて透明化を行う場合には組織の大きさや特徴を鑑みた上で適切な透明化手法を検討する必要が求められる。また、CUBIC 法を含む多くの透明化手法は透明化処理後の組織の膨潤が報告されている [16]。膨潤の程度はわずかであり、細胞の相対的な位置関係に著変はないものの、組織内の構造物や局在についても慎重な比較検討が必要であると考えられる。また歯周組織への応用が報告されている PEGASOS 法 [22]については、CUBIC 法の試薬を改良し非常に透明度が高い方法の一つとして評価されているが、軟組織の収縮を起こすことが欠点として挙げられており、透明化処理により脳組織が頭蓋骨から剥がれる事例が報告 [21]されている。そのため、軟組織と硬組織により構成され脈管系に富んだ歯周組織の透明化には CUBIC 法が最も適していると考察している。

本研究において、これまで報告のないマウス歯肉由来のリンパ管内皮細胞の初代培養に成功した（図 8A-B）。樹立した細胞は血管内皮細胞や他組織のリンパ管内皮細胞の培養条件にて継代維持が可能であった。凍結・融解を含む数代の継代後においても、同細胞は tdTomato 蛍光および Lyve-1 を発現している（図 8C）ことに加えて、マトリゲル中で三次元培養を行ったところ、リンパ管内皮細胞の性質として報告 [47]されている管状構造を形成した（図 8D）ことから、同細胞が機能的にもリンパ管内皮細胞であることが示唆された。さらに本研究では *in vitro* で培養歯肉リンパ管内皮細胞を VEGF-C C156S 刺激し、24 時間後に RNA-seq 解析により遺伝子発現プロファイルの変化を検討した（図 9B）。VEGF-C C156S 刺激後の遺伝子発現解析により、アポトーシス関連遺伝子の有意な発現変動を認めた（図 9C-D）。アポトーシス誘導因子 HIPK2 を分解することでアポトーシスを抑制する Siah1 [48]発現が上昇している一方で、p53 を介したアポトーシスを誘導する Ell3 [49]発現減少している等、VEGF-C C156S によりリンパ管内皮細胞のアポトーシスが抑制されている可能性が示唆される。ヒト皮膚リンパ管内皮細胞における報告においても血清スタベーションにより誘導されるアポトーシスが VEGF-C C156S により保護されるという報告 [50]に一

致しており、今後、細胞の増殖やアポトーシスなどの動態に VEGF-C C156S が与える影響を検討することで、*in vivo* において歯周組織修復を促進した VEGF-C C156S（図 7C）の作用機序の一端が明らかになるものと期待される。

本研究により、歯周組織におけるリンパ管の局在および、組織修復過程におけるリンパ管の増加と修復促進作用が明らかとなった。今後リンパ管のさらなる解析を通じて、歯周組織におけるリンパ管の動態や機能の理解、さらには歯周組織恒常性維持機構の理解が更に深まるとともに、新たな歯周組織再生療法の開発につながる基盤情報が得られるものと期待される。

結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1. 平常時の歯肉の結合組織部において、血管周囲にリンパ管の走行が確認された。

2. 絹糸結紮除去直後では、対照側と比較して、損傷部歯肉肉芽組織においてリンパ管の減少を認め、同結紮除去 7 日時点では、結紮除去直後および対照側と比較して、修復歯槽骨上部の歯肉肉芽組織において、リンパ管の増加を認めた。

3. 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明らかとなり、同リンパ管ネットワークは組織修復時にはより密に分布することが明らかとなった。

4. 歯周組織の修復時には、歯肉上皮における *Vegfc* 発現が増加することが明らかとなった。

5. 損傷歯周組織に VEGF-C C156S を局所投与したところ、同組織の修復が亢進した。

6. 歯肉リンパ管内皮細胞の単離培養に成功し、同細胞は VEGF-C C156S 刺激によりアポトーシス関連遺伝子の発現が有意に変動した。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、岩山智明助教に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Oliver G, Kipnis J, Randolph GJ, Harvey NL. The Lymphatic Vasculature in the 21st Century: Novel Functional Roles in Homeostasis and Disease. Cell. 2020 Jul 23;182(2):270–96.

2. Butler MG, Dagenais SL, Rockson SG, Glover TW. A novel VEGFR3 mutation causes Milroy disease. Am. J. Med. Genet. A. 2007 Jun 1;143A(11):1212–7.

3. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, Alitalo K, Finegold DN. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. Nat. Genet. 2000 Jun;25(2):153–9.

4. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature. 2015 Jul 16;523(7560):337–41.

5. Liu X, De la Cruz E, Gu X, Balint L, Oxendine-Burns M, Terrones T, Ma W, Kuo H-H, Lantz C, Bansal T, Thorp E, Burridge P, Jakus Z, Herz J, Cleaver O, Torres M, Oliver G. Lymphoangiocrine signals promote cardiac growth and repair. Nature. 2020 Dec;588(7839):705–11.

6. Gur-Cohen S, Yang H, Baksh SC, Miao Y, Levorse J, Kataru RP, Liu X, de la Cruz-Racelis J, Mehrara BJ, Fuchs E. Stem cell-driven lymphatic remodeling coordinates tissue regeneration. Science. 2019 Dec 6;366(6470):1218–25.

7. Huggenberger R, Ullmann S, Proulx ST, Pytowski B, Alitalo K, Detmar M. Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation. J. Exp. Med. 2010 Sep 27;207(10):2255–69.

8. Ushijima N, Inoue K, Domon T, Yoshida S. Distribution and organization

of lymphatic vessels in the mouse gingiva: An immunohistochemical study with LYVE-1. Arch. Oral Biol. 2008 Jul;53(7):652–8.

9. Mkonyi LE, Bletsa A, Fristad I, Wiig H, Berggreen E. Importance of lymph vessels in the transcapillary fluid balance in the gingiva studied in a transgenic mouse model. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2010 Aug;299(2):H275-83.

10. Mkonyi LE, Bakken V, Søvik JB, Mauland EK, Fristad I, Barczyk MM, Bletsa A, Berggreen E. Lymphangiogenesis is induced during development of periodontal disease. J. Dent. Res. 2012 Jan;91(1):71–7.

11. Raica M, Cimpean AM, Popovici RA, Balica AR, Vladau M, Gaje PN. Mast cells stimulate lymphangiogenesis in the gingiva of patients with periodontal disease. In Vivo. 2015 Jan;29(1):29–34.

12. Mkonyi LE, Bletsa A, Bolstad AI, Bakken V, Wiig H, Berggreen E. Gingival lymphatic drainage protects against Porphyromonas gingivalis-induced bone loss in mice. Am. J. Pathol. 2012 Sep;181(3):907–16.

13. Papadakou P, Bletsa A, Yassin MA, Karlsen TV, Wiig H, Berggreen E. Role of Hyperplasia of Gingival Lymphatics in Periodontal Inflammation. J. Dent. Res. 2017 Apr;96(4):467–76.

14. Wang H, Chen Y, Li W, Sun L, Chen H, Yang Q, Zhang H, Zhang W, Yuan H, Zhang H, Xing L, Sun W. Effect of VEGFC on lymph flow and inflammation-induced alveolar bone loss. J. Pathol. 2020 Jul;251(3):323–35.

15. Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, Miyawaki A. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. Nat. Neurosci. 2015 Oct;18(10):1518–29.

16. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T,

Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Cell Rep. 2018 Aug 21;24(8):2196-2210.e9.

17. Ke M-T, Imai T. Optical Clearing and Index Matching of Tissue Samples for High-resolution Fluorescence Imaging Using SeeDB2. Bio Protoc. 2018 Oct 20;8(20):e3046.

18. Bozycki L, Łukasiewicz K, Matryba P, Pikula S. Whole-body clearing, staining and screening of calcium deposits in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Skelet. Muscle. 2018 Jul 19;8(1):21.

19. Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Ode KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. Nat. Commun. 2020 Apr 27;11(1):1982.

20. Ke M-T, Nakai Y, Fujimoto S, Takayama R, Yoshida S, Kitajima TS, Sato M, Imai T. Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. Cell Rep. 2016 Mar 22;14(11):2718–32.

21. Jing D, Zhang S, Luo W, Gao X, Men Y, Ma C, Liu X, Yi Y, Bugde A, Zhou BO, Zhao Z, Yuan Q, Feng JQ, Gao L, Ge W-P, Zhao H. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. Cell Res. 2018 Aug;28(8):803–18.

22. Yi Y, Men Y, Jing D, Luo W, Zhang S, Feng JQ, Liu J, Ge W-P, Wang J, Zhao H. 3-dimensional visualization of implant-tissue interface with the polyethylene glycol associated solvent system tissue clearing method. Cell Prolif. 2019 May;52(3):e12578.

23. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O,

Benner C, Chanda SK. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. Nat. Commun. 2019 Apr 3;10(1):1523.

24. Berggreen E, Haug SR, Mkonyi LE, Bletsa A. Characterization of the dental lymphatic system and identification of cells immunopositive to specific lymphatic markers. Eur. J. Oral Sci. 2009 Feb;117(1):34–42.

25. An JY, Kerns KA, Ouellette A, Robinson L, Morris HD, Kaczorowski C, Park S-I, Mekvanich T, Kang A, McLean JS, Cox TC, Kaeberlein M. Rapamycin rejuvenates oral health in aging mice. Elife [Internet]. 2020 Apr 28;9. Available from: http://dx.doi.org/10.7554/eLife.54318

26. Berggreen E, Wiig H. Lymphatic function and responses in periodontal disease. Exp. Cell Res. 2014 Jul 15;325(2):130–7.

27. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. Nature. 2005 Dec 15;438(7070):946–53.

28. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Förster R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. Immunity. 2004 Aug;21(2):279–88.

29. Koning JJ, Konijn T, Lakeman KA, O'Toole T, Kenswil KJG, Raaijmakers MHGP, Michurina TV, Enikolopov G, Mebius RE. Nestin-Expressing Precursors Give Rise to Both Endothelial as well as Nonendothelial Lymph Node Stromal Cells. J. Immunol. 2016 Oct 1;197(7):2686–94.

30. Petrova TV, Koh GY. Organ-specific lymphatic vasculature: From development to pathophysiology. J. Exp. Med. 2018 Jan 2;215(1):35–49.

31. Wong BW, Zecchin A, García-Caballero M, Carmeliet P. Emerging Concepts in Organ-Specific Lymphatic Vessels and Metabolic Regulation of Lymphatic Development. Dev. Cell. 2018 May 7;45(3):289–301.

32. Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Stanczuk L, Tatin F, Kizhatil K, John SWM, Alitalo K, Ortega S, Makinen T. Nonvenous origin of dermal lymphatic vasculature. Circ. Res. Am Heart Assoc; 2015 May 8;116(10):1649–54.

33. Stanczuk L, Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Zhang Y, Laviña B, Fruttiger M, Adams RH, Saur D, Betsholtz C, Ortega S, Alitalo K, Graupera M, Mäkinen T. cKit Lineage Hemogenic Endothelium-Derived Cells Contribute to Mesenteric Lymphatic Vessels. Cell Rep. 2015 Mar 17;10(10):1708–21.

34. Kinashi H, Ito Y, Sun T, Katsuno T, Takei Y. Roles of the TGF-β–VEGF-C Pathway in Fibrosis-Related Lymphangiogenesis. Int. J. Mol. Sci. [Internet]. 2018 Aug 23;19(9). Available from: http://dx.doi.org/10.3390/ijms19092487

35. Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. J. Biol. Chem. 1998 Apr 3;273(14):8413–8.

36. Gauvrit S, Villasenor A, Strilic B, Kitchen P, Collins MM, Marín-Juez R, Guenther S, Maischein H-M, Fukuda N, Canham MA, Brickman JM, Bogue CW, Jayaraman P-S, Stainier DYR. HHEX is a transcriptional regulator of the VEGFC/FLT4/PROX1 signaling axis during vascular development. Nat. Commun. 2018 Jul 13;9(1):2704.

37. Saaristo A, Veikkola T, Tammela T, Enholm B, Karkkainen MJ, Pajusola K, Bueler H, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Lymphangiogenic gene therapy with minimal blood vascular side effects. J. Exp. Med. 2002 Sep 16;196(6):719–30.

38. Kajiya K, Sawane M, Huggenberger R, Detmar M. Activation of the VEGFR-3 pathway by VEGF-C attenuates UVB-induced edema formation and skin inflammation by promoting lymphangiogenesis. J.

Invest. Dermatol. 2009 May;129(5):1292–8.

39. Song E, Mao T, Dong H, Boisserand LSB, Antila S, Bosenberg M, Alitalo K, Thomas J-L, Iwasaki A. VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. Nature. 2020 Jan;577(7792):689–94.

40. Zhang D, Huang J, Sun X, Chen H, Huang S, Yang J, Du X, Tan Q, Luo F, Zhang R, Zhou S, Jiang W, Ni Z, Wang Z, Jin M, Xu M, Li F, Chen L, Liu M, Su N, Luo X, Yin L, Zhu Y, Feng JQ, Chen D, Qi H, Chen L, Xie Y. Targeting local lymphatics to ameliorate heterotopic ossification via FGFR3-BMPR1a pathway. Nat. Commun. 2021 Jul 19;12(1):4391.

41. Ahn JH, Cho H, Kim J-H, Kim SH, Ham J-S, Park I, Suh SH, Hong SP, Song J-H, Hong Y-K, Jeong Y, Park S-H, Koh GY. Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. Nature. 2019 Aug;572(7767):62–6.

42. Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, Smirnov I, Cornelison RC, Kingsmore KM, Contarino C, Onengut-Gumuscu S, Farber E, Raper D, Viar KE, Powell RD, Baker W, Dabhi N, Bai R, Cao R, Hu S, Rich SS, Munson JM, Lopes MB, Overall CC, Acton ST, Kipnis J. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. Nature. 2018 Aug;560(7717):185–91.

43. Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Jiao Y, Gillilland MG 3rd, Hayashi A, Imai J, Sugihara K, Miyoshi M, Brazil JC, Kuffa P, Hill BD, Rizvi SM, Wen F, Bishu S, Inohara N, Eaton KA, Nusrat A, Lei YL, Giannobile WV, Kamada N. The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. Cell. 2020 Jul 23;182(2):447-462.e14.

44. Kenney JW, Steadman PE, Young O, Shi MT, Polanco M, Dubaishi S, Covert K, Mueller T, Frankland PW. A 3D adult zebrafish brain atlas (AZBA) for the digital age. Elife [Internet]. 2021 Nov 22;10. Available

from: http://dx.doi.org/10.7554/eLife.69988

45. Rusch H, Brammerloh M, Stieler J, Sonntag M, Mohammadi S, Weiskopf N, Arendt T, Kirilina E, Morawski M. Finding the best clearing approach - Towards 3D wide-scale multimodal imaging of aged human brain tissue. Neuroimage. 2021 Dec 17;118832.

46. Almagro J, Messal HA, Zaw Thin M, van Rheenen J, Behrens A. Tissue clearing to examine tumour complexity in three dimensions. Nat. Rev. Cancer. 2021 Nov;21(11):718–30.

47. Kazenwadel J, Secker GA, Betterman KL, Harvey NL. In vitro assays using primary embryonic mouse lymphatic endothelial cells uncover key roles for FGFR1 signalling in lymphangiogenesis. PLoS One. 2012 Jul 6;7(7):e40497.

48. Winter M, Sombroek D, Dauth I, Moehlenbrink J, Scheuermann K, Crone J, Hofmann TG. Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR. Nat. Cell Biol. 2008 Jul;10(7):812–24.

49. Lee J-Y, Lee S-H, Kim K-S, Park K-H, Park K-S. Ell3 functions as a critical decision maker at the crossroad between stem cell senescence and apoptosis. Stem Cell Res. Ther. 2019 Jan 17;10(1):32.

50. Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. EMBO J. 2001 Sep 3;20(17):4762–73.