

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462799

研究課題名(和文) マウス顎顔面発生におけるリンパ管新生と分子機構の解明

研究課題名(英文) Early lymphatic vasculogenesis in the craniofacial region of embryonic mice

研究代表者

佐藤 かわり (SATO, KAORI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：90287772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リンパ管形態形成とリンパ管内皮細胞の表現型推移に着目して、顎顔面領域でのリンパ管の発生機序について分子生物学的、免疫組織化学的解析により検討した。その結果、リンパ管発生関連の遺伝子群は胎生14.5日前後で発現ピークを示すこと、顎顔面領域のリンパ管内皮細胞は体幹部主静脈の血管内皮細胞に由来し、遠隔の顎顔面領域まで体幹部背側の狭い間隙を遊走すること、顎顔面領域のうち、最も早く下顎突起に到達すること(胎生10.5日)、下顎突起では単独遊走集簇配列管腔形成の順序でリンパ管の形態形成が起こること、各段階のリンパ管内皮細胞では発現する分子の変遷がみられることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We focused on differentiation of the lymphatic endothelial cells (LECs) and development of the lymphatic vessels in the craniofacial region of mouse embryos. ICR mouse embryos from E9.5-18.5 were used to collect the tissues in the craniofacial region. Gene expression profiling was performed using microarray, and was validated by qPCR and immunostaining. The gene expression analysis indicated that the high-level expression of Sox18, CoupTF2 and Prox1 showed at E11.5-12.5, E13.5 and E14.5, respectively. LECs differentiated from the venous endothelial cells (VECs) and sprouted in the cardinal veins of the truncal regions. Their LECs scattered, migrated away forward the craniofacial region, and arrived at the mandibular arches at E10.5. LECs aggregated, and the lymph sacs and lymphatic vessels were beginning to form after E12.5 and E14.5, respectively. We established the developmental processes of lymphatic vessels that originated from VECs of the cardinal veins in the craniofacial region.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 病理学 マウス胎仔 顎顔面発生 リンパ管新生 リンパ管内皮細胞 細胞分化制御 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は血管とともに脊椎動物における体液の恒常性維持、免疫応答などに重要な役割を果たしている。炎症や腫瘍病変においては、リンパ管新生誘導が病変の成り立ちや予後を大きく作用する要因ともなっている。

マウス胎仔におけるリンパ管初期発生については、胎生 9.5 日前後の動脈・静脈分化に引き続いて前主静脈内皮細胞からリンパ管内皮前駆細胞が分化し、静脈壁から出芽したリンパ管内皮細胞は、深リンパ嚢を形成する細胞群と、体表近傍まで細胞遊走を経て浅リンパ管網を形成する細胞群の存在が報告されている (Francois ら, 2010)。リンパ管内皮細胞が集簇したリンパ嚢では、リンパ管腔の形成と伸長・分枝・融合により毛細リンパ管および平滑筋・弁を備えた集合リンパ管によるリンパ管網が構築されていくことが明らかにされてきている。

胎生期にみられるリンパ管内皮細胞系譜の増殖・分化制御については、炎症・腫瘍微小環境でのリンパ管新生においても再賦活化されている可能性が高く、個体発生と成体におけるリンパ管形成に働く細胞動態と分子機序については多くの関心を集めている。

リンパ管初期発生に働く分子制御因子として、*Prox1* はリンパ管内皮形質の発現に必須の転写因子である。*Prox1* の発現誘導は *Sox18* と静脈分化に働く *Coupled TF2* により制御されていることが知られている (Koltowska ら, 2013)。また、ゼブラフィッシュの胸管発生モデルでは *Cxcl12-Cxcr4* ケモカインシグナルが血管走行と併走するリンパ管構築を遂げるうえでのガイダンス機構として働いていることが報告されている (Cha ら, 2012)。近年、注目され始めている non-coding RNA の 1 つである microRNA が遺伝子発現や細胞機能の制御に重要な役割を有していることが明らかにされつつある。胎生期のリンパ管発生に関しても microRNA の関与が想定される。

われわれの前主静脈近傍でのリンパ管初期発生の予備観察において、胎生 9.5 日前後の前主静脈内皮細胞では細胞核が *Coupled TF2/Prox1* 陽性を示し、胎生 10.5~11.5 日にかけて *Prox1* 陽性/*Lyve1* 陽性のリンパ管内皮細胞が出芽・遊走を始めることを確かめている。リンパ管内皮細胞系譜の遊走能に関連して、リンパ管内皮細胞が *Prox1* 制御下で *Vegfr3* を発現しており、近傍の間葉細胞が産生するリガンド分子 (*Vegfc* や *Vegfd*) に向けて遊走することが注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、舌原基下部の静脈を起点としたリンパ管構築に至るリンパ管内皮系譜の細胞動態とその分子制御機構について検討した。最初に、顎顔面諸器官の形態形成にもなう血管・リンパ管の構築を時空間で俯瞰することを目的として、胎生 11.5~17.5 日

のマウス胎仔頭部全域を *Pecam1/Lyve1* 二重免疫標識により組織立体構築した。特に、舌原基下部におけるリンパ管内皮の分化・出芽・遊走の空間局在を捉える目的で、リンパ管内皮細胞マーカー抗体を組み合わせた多重免疫標識・組織立体構築を実施した。この形態観察とともに、マウス胎生日齢に沿って舌原基下部を採取し、マイクロアレイとリアルタイム PCR 法でリンパ管発生段階にともなう遺伝子発現変動を明らかにした。

3. 研究の方法

日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会のガイドラインに従って、実験動物として ICR 妊娠マウスを使用し、所定の妊娠時期まで飼育した。試料採取に際しては、胎生 9.5~18.5 日の妊娠マウスを麻酔による安楽死後、速やかに胎仔個体を摘出し、体幹部を含む頭部口腔顎顔面部分を採取した (各時期の胎仔約 30 個体を使用)。

DNA マイクロアレイ解析には、45,101 プローブ (全遺伝子数 22,402 個に相当) をプロットした GeneChip® アレイ (Mouse Expression 430 2.0 Array, Affymetrix) と Gene Spring (ver.7.3.1, Silicon Genetics Inc., USA) により時期・部位別に発現変動を示す遺伝子リスト (Gene Lists) を作成するとともに、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析 (Ingenuity Systems, USA) を使って遺伝子プロファイリングを実施した。遺伝子相互のパスウェイ解析には IPA のほかに、KEGG パスウェイ (京都大学, www.genome.jp/kegg) を使用した。DNA マイクロアレイ法で検出された遺伝子発現レベルを検証する目的では、アレイ分析用試料をリアルタイム PCR で定量分析した。遺伝子発現の部位特異性を検証する目的では、免疫組織化学による翻訳産物の局在を確認するとともに、EMAGE/ MGI (mRNA *in situ* hybridization database) データベースの ISH 画像から遺伝子発現部位を確認した。さらに、両突起の微細領域での遺伝子発現を確認する目的で、組織顕微切断とリアルタイム PCR による解析を実施した。

免疫組織学的解析では、静脈内皮からのリンパ管内皮細胞の分化、出芽・遊走、集簇・リンパ嚢の形成・リンパ管腔形成の一連の過程におけるリンパ管内皮細胞の局在とその表現型を追跡するために、リンパ管内皮細胞 (*Vegfr3*・*Lyve1*・*Ccl21*) と分化誘導因子 (*Prox1*・*Vegfc*)、静脈内皮細胞 (*Coupled TF2*・*Pecam1*・*Endomucin*) の特異抗体を用いた多重免疫染色を実施した。さらに、*Prox1/Vegfr3* 二重免疫染色を施した頭部領域のパラフィン連続切片から組織立体構築し、顎顔面領域内のすべてのリンパ管内皮細胞を 3 次元空間にマッピングした。リンパ管内皮細胞の出芽・遊走に関する周囲環境からのシグナルを調べる目的では、*Vegfc*、*Vegfd*、*Cxcl12*、*Cxcr4*、*AhR* 抗体を用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 顎顔面領域でのリンパ管発生に関わる時期特異的な発現を示す遺伝子群

顎顔面領域での異なる胎齢期の試料間での DNA マイクロアレイデータに基づいた遺伝子発現の網羅的な解析と IPA による遺伝子群の機能・パスウェイなどのアノテーション解析によって、胎生 9.5 日からは血管新生に関わる遺伝子群の有意な発現変動がみられるのに対して、リンパ管発生に関連する遺伝子群は胎生 11.5 日から 14.5 日にかけて発現上昇することが明らかとなった。リンパ管内皮細胞のマーカーである *Prox1*、*Lyve1*、*Podoplanin*、*Nfatc1* などの遺伝子が発現上昇していた。

これらの DNA マイクロアレイ解析の検証、ならびにリアルタイム PCR による詳細な定量解析によって、*Prox1* の上流にある *Sox18* は胎生 11.5~12.5 日、静脈分化の制御因子である *Couptf2* は胎生 13.5 日、リンパ管内皮細胞の分化誘導に中心的な役割を果たす *Prox1* は胎生 14.5 日でそれぞれ発現ピークを示した。リンパ管内皮細胞の分化に寄与する *Vegfr3* の発現は構成的であったが、*VegfC* は胎生 11.5 日付近で高発現であり、*Lyve1*・*Podoplanin*・*Ccl21* は胎生 14.5~16.5 日で高い発現を示した。これらは先に示した IPA 解析での結果とも一致しており、胎生 14.5 日前後でのリンパ管の形態形成と新生が想定された。

さらに、遺伝子発現解析とアノテーション解析から、顎顔面領域でのリンパ管発生に関わる新たな分子（遺伝子）を検討した結果、Aryl-hydrocarbon receptor (AhR) が *Ccl21* の発現誘導に関与していることが推察された。

また、*microRNA* についての検討では、*Prox1* を標的とする *miR-31* と *miR-181a*、*Vegfr3* を標的とする *miR-1236*、*Cxcl12* を標的とする *miR-135* が顎顔面領域のリンパ管発生に寄与していることが示唆された。

(2) 顎顔面領域でのリンパ管内皮細胞の由来とリンパ管形態形成

Prox1/Vegfr3 二重免疫染色した連続切片に基づく組織立体観察と多重蛍光免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡観察によって、顎顔面領域のリンパ管内皮細胞の起源は主静脈の血管内皮細胞であることが判明した。さらに、胎性 9.5 日前後で体幹部主静脈から分化したリンパ管内皮細胞は、出芽し、遠隔の顎顔面領域まで遊走して胎生 10.5 日に下顎突起に到達することを確かめた。次いで、顎顔面領域でのリンパ管内皮細胞の分布と成熟過程（単独遊走 集簇 配列 管腔形成）を経時的に解析した結果、これらのリンパ管内皮細胞は胎生 11.5 日で小集団をつくり、胎性 13.5 日前後でリンパ囊の形成を経て、胎生 14.5 日で管腔を有するリンパ管が形成されることが明らかとなった。

先に述べた遺伝子発現解析とアノテーション解析から推測された AhR の *Ccl21* の発現誘導への関与について、免疫組織学的に検討した結果、胎生 11.5~14.5 日の *Prox1/Ccl21/AhR* 陽性のリンパ管内皮細胞と近傍に位置する AhR 陽性の非リンパ管内皮細胞の存在が確かめられた。このことから、AhR は *Ccl21* の発現を介して、リンパ管内皮細胞の分化やリンパ管の形態形成に寄与していると考えられ、リンパ管発生に関わる新たな分子であることが示唆された。

(3) リンパ管内皮細胞の動態と発現マーカー分子の変遷

体幹部の主静脈血管内皮細胞の表現型は *Prox1* (-)/*Vegfr3* (+)/*Lyve1* (-)/*CCL21* (-)/*Couptf2* (+)/*Endomucin* (+) であるが、胎性 9.5 日に主静脈から分化したリンパ管内皮細胞は *Prox1* (+)/*Vegfr3* (+)/*Lyve1* (+)/*CCL21* (-)/*Endomucin* (+) となった。

顎顔面領域に向けて個々に分散して遊走し始めたリンパ管内皮細胞は *Lyve1* (-) となり、遊走中、*Lyve1* (-) は維持された。顎顔面領域に到達しリンパ管内皮細胞の小集団を形成し始める（胎生 11.5 日）と、表現型は *CCL21* (+)/*Endomucin* (-) となった。集簇したリンパ管内皮細胞が再配列してリンパ囊を形成した後、内腔を有したリンパ管が構築される（胎生 14.5 日）とリンパ管内皮細胞の表現型は *Lyve1* (+) に復帰することが確かめられた。これ以降、少なくとも出産段階まで、顎顔面領域のリンパ管内皮細胞は *Prox1* (+)/*Vegfr3* (+)/*Lyve1* (+)/*CCL21* (+)/*Couptf2* (+)/*Endomucin* (-) の表現を維持していた。

(4) まとめ

本研究では、顎顔面領域でのリンパ管発生に関して、関連する遺伝子の発現解析とともに、リンパ管内皮細胞を同定する時空間的に適切なマーカー分子を決定し、顎顔面領域のリンパ管内皮細胞の由来を明らかにした上で、顎顔面領域までの遊走経路と時期を確かめた。顎顔面領域に到達後のリンパ管形態形成の過程を詳細に追跡するとともに、リンパ管内皮細胞の表現型の変遷を明らかにした。

平成 29 年度より採択された科研費申請課題では、本研究をさらに発展させ、主静脈を起点として遠隔の下顎突起までのリンパ管内皮細胞の移住とその誘導に関わるガイド機構の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sugimoto T, Taya Y, Shimazu Y, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Three-dimensional visualization of developing neurovascular architecture in the craniofacial region of

embryonic mice. Anat. Rec. (査読有), 298, 1824-1835, 2015. doi: 10.1002/ar.23179.

Sasaki T, Taya Y, Saito K, Fujita K, Aoba T, Fujiwara T: Molecular contribution to cleft palate production in cleft lip mice. Int. Congenital Anomalies (査読有), 54: 94-99, 2014, doi: 10.1111/cga.12038.

〔学会発表〕(計 6 件)

田谷雄二, 白子要一, 佐藤かおり, 添野雄一: マウス顎顔面領域におけるリンパ管発生, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセンター, (北海道・札幌市).

Taya Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y: Lymphangiogenesis in the craniofacial region of embryonic mice, SDB (Society for Developmental Biology) 75th Annual Meeting - ISD (International Society of Differentiation) 19th International Conference, 2016 年 8 月 4-8 日, Boston (USA).

田谷雄二, 添野雄一, 白子要一, 佐藤かおり: 胎生期マウスの顎顔面領域におけるリンパ管初期発生, 平成 27 年度日本歯科大学歯学会第 2 回ウィンターミーティング, 2015 年 12 月 5 日, 日本歯科大学生命歯学部 (東京都・千代田区).

田谷雄二, 添野雄一, 白子要一, 青葉孝昭, 佐藤かおり: マウス顎顔面発生における静脈からのリンパ管内皮細胞の分化, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市).

添野雄一, 白子要一, 島津徳人, 田谷雄二, 佐藤かおり, 青葉孝昭: 扁平上皮癌の同所移植モデルにおける原発-リンパ節転移環境での脈管間質形成の比較, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島国際会議場 (広島県・広島市).

白子要一, 添野雄一, 島津徳人, 田谷雄二, 佐藤かおり, 青葉孝昭: 癌微小環境における脈管新生の 3 次元形態解析: 腫瘍-宿主境界での脈管チャネルの空間分布, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島国際会議場 (広島県・広島市).

〔図書〕(計 4 件)

田谷雄二, 添野雄一 (分担執筆): 6 章 口腔・顎顔面領域の先天異常, 新スタンダード口腔病理学(槻木恵一, 岡田康男編集), pp 100-103, 学建書院, 東京, 2017 年.

佐藤かおり (分担執筆): 日本歯科大学 病

理学講座編 (青葉孝昭 監修 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一 編集): 講義ノート 歯と歯周組織の病理学, キタ・メディア, 東京, 2014 年.

佐藤かおり (分担執筆): 日本歯科大学 病理学講座編 (青葉孝昭 監修 佐藤かおり 編集): 歯学生のための最新・病態病理学入門 (EPUB 版), 杏林社, 東京, 2014 年.

佐藤かおり (分担執筆): 日本歯科大学 病理学講座編 (青葉孝昭 監修 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一 編集): 講義ノート 歯と歯周組織の病理学 (EPUB 版), 杏林社, 東京, 2014 年.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 かおり (SATO, Kaori)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 9 0 2 8 7 7 7 2

(2) 研究分担者

田谷 雄二 (TAYA, Yuji)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号: 3 0 1 9 7 5 8 7

添野 雄一 (SOENO, Yuuichi)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号: 7 0 3 5 0 1 3 9

島津 徳人 (SHIMAZU, Yoshihito)
麻布大学・生命・環境科学部・准教授
研究者番号: 1 0 2 9 7 9 4 7