

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11631

研究課題名(和文) マウス顎顔面発生におけるリンパ管内皮細胞の移住とガイダンスの分子制御機構

研究課題名(英文) Molecular regulation of directed migration of lymphatic endothelial cells to the craniofacial region in lymphatic vascular development

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)：顎顔面領域のリンパ管を構成するリンパ管内皮細胞は、先行研究により体幹部の主静脈を起源とすることを明らかにしている。本研究では、主静脈から下顎突起までのリンパ管内皮細胞の移住と誘導に関わる機序について分子生物学的、免疫組織化学的解析、ならびに組織立体観察により検討した。その結果、リンパ管内皮細胞の誘導因子Vegfcは胎生13.5～14.5日で発現上昇を示し、その受容体であるVegfr3とNrp2も同時期での発現が確かめられた。それとは別に、移住途上にあるリンパ管内皮細胞と体幹部や下顎突起内の細胞との相互作用に働く新規の誘導因子としては、Cxcl12-Cxcr4シグナルが有力な候補に挙がった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重篤なリンパ浮腫や癌転移等の種々の病態では、リンパ管新生誘導が病変の成り立ちや予後に大きく作用する要因ともなっている。これらの病態のみならず、リンパ管を標的とした再生医学の観点からも、胎生期でのリンパ管の発生機構を解明することは重要なカギとなる。本研究の成果として、リンパ管発生の仕組み、特にリンパ管内皮細胞の動態や分化の制御機構を明らかにできたことは意義深い。また、本研究で、口腔顎顔面領域でのリンパ管発生の機序を明らかにできたことは、この分野の研究に貢献できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We previously found that the craniofacial lymphatic endothelial cells (LECs) originate the venous endothelial cell in cardinal veins of the embryonic mice. This study aimed to investigate how directed migration of LECs from cardinal veins to mandibular arches were regulated. The analyses of immunohistochemistry and histology-based 3D observation revealed the migration route of LECs from the trunk to the craniofacial region, and lymphatic vascular development and the process of lymphatic development in the craniofacial region. In the gene expression analysis, the peak expression levels of Vegfc, which induced the migrating LECs, were shown in the mandibular arches at E13.5-14.5, although Vegfc receptor Vegfr3 and Nrp2 was expressed constitutively. Moreover, we found the reliable molecular cues such as chemokine Cxcl-Cxcr signaling as well as Vegfc that induced the migrating LECs to mandibular arches.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 病理学 マウス顎顔面発生 リンパ管形成 リンパ管内皮細胞 ガイダンス因子 細胞遊走

1. 研究開始当初の背景

リンパ管網は組織液の恒常性維持や免疫監視機構として働き、脂質や脂溶性ビタミンの摂取に重要な役割を果たしている。さらに、重篤なリンパ浮腫や癌転移等の種々の病態では、リンパ管新生誘導が病変の成り立ちや予後に大きく作用する要因ともなっている。これらの病態のみならず、リンパ管を標的とした再生医学の観点からも、胎生期でのリンパ管発生の仕組み、特にリンパ管内皮細胞の動態や分化制御の解明は重要なカギとなる。

マウスのリンパ管内皮は体幹部主静脈や、卵黄嚢細胞、血管芽細胞を起源とすることが知られている。体幹部主静脈を起源とする場合では、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)。これらの細胞から分化したリンパ管内皮細胞はリンパ嚢の形成を経て、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を構築していく。

最近の研究では、体幹部主静脈近傍のリンパ管発生において、Balloon モデルと Budding モデル、そして移住モデルが提唱されている(Chen ら, 2015)。Balloon モデルは主静脈からリンパ管内皮細胞が風船のように連なってリンパ嚢を生じ、Budding モデルは主静脈の複数箇所から出芽したリンパ管内皮細胞の連なりが互いに連結や切断によりリンパ嚢を形作る。移住モデルは主静脈からリンパ管内皮細胞が直接、出芽して遊走する様式である。

顎顔面領域のリンパ管の発生ではどのモデルに当てはまるかは今までに明らかにされておらず、また、主静脈を発したリンパ管内皮細胞が下顎突起へと誘導される制御機構についてはいまだ不明のままである。

2. 研究の目的

近年、ガイダンス因子として、細胞から分泌されるサイトカイン等の液性因子のほか、細胞同士が直接接触する受容体を介したシグナル交換や細胞外基質からのシグナル誘導、細胞から分泌されるエクソソーム内の microRNA などの役割も注目されている。本研究では、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ダンス機構の解明を目的として、移住経路近傍の諸細胞およびゴールとなる下顎突起内の細胞等から発せられるガイダンス因子とその分子制御の仕組みを明らかにする。

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、主静脈を含む体幹部と顎顔面部を採取した。

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 microRNA 発現には Mouse miRNA アレイ(SurePrint G3 Mouse miRNA 8x60K ref21, Agilent)を用いて発現解析および mRNA と miRNA 間のデータの統合解析を行った。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。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) 静脈内皮細胞 (CoupTF2・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、リンパ管内皮の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 Prox1/Vegfr3 二重免疫染色を施した頭頸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 抗体を用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

本研究の成果として注目されることは、顎顔面領域でのリンパ管形成では、体幹部に形成されたリンパ管から分枝して顎顔面領域に挿入してくるリンパ管新生の様式ではなく、個々に移住したリンパ管内皮細胞が凝集・リンパ嚢形成・管腔を有するリンパ管の形成の過程を経て発生することが明らかとなった。

マウス胎仔の顎顔面領域での多重免疫染色と組織立体構築法による解析を行い、顎顔面領域のリンパ管内皮細胞は体幹部主静脈を起源とし、主静脈の血管内皮細胞から分化したリンパ管内皮細胞は出芽し、決まった経路を辿って顎顔面領域まで遊走して、顎顔面領域のなかで下顎突起に最も早く到達することが明らかとなった。体幹部主静脈から遊走を開始したリンパ管内皮細胞の先頭集団は胎生 10.5 日頃には下顎突起の入り口付近、胎生 11.5 日には下顎突起の先端部近くまで遊走していることが突き止められた。

下顎突起を含む顎顔面領域に到着したリンパ管内皮細胞は互いに接着し凝集して、中空のリンパ嚢の形成を経て、管腔を有するリンパ管の形成に至ること (胎生 14.5 日以降) が確かめられた。

遊走するリンパ管内皮細胞の方向を誘導する因子を含むリンパ管形成に関わる遺伝子の発現について網羅的に列挙するために、ICR マウス胎仔 (E9.5~11.5) のリンパ管内皮細胞の下顎突起までの移住経路において、リンパ管内皮細胞を含む領域の組織を採取し、DNA マイクロアレイ、ならびに microRNA マイクロアレイの解析を行った。IPA 等を使ったデータ処理を行い、発現プロファイルを作成した。これらの分析結果について、リアルタイム RT-PCR により細胞誘導因子と受容体、ならびにマイクロアレイ解析で新たに抽出された遺伝子および microRNA の発現の検証を行った。その結果、Gene Ontology (GO) 解析から、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が、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誘導因子 Vegfc は胎生 13.5~14.5 日で発現上昇を示し、その受容体である Vegfr3 と Nrp2 も同時期に発現しているのが確かめられた。それとは別に、移住途上にあるリンパ管内皮細胞と体幹部や下顎突起内の細胞との相互作用に働く新規の誘導因子としては、Cxcl12 - Cxcr4 シグナルが有力な候補に挙げられた。さらに、リンパ管内皮細胞の遊走に関わるガイダンス機構で働く遺伝子の発現制御を担う microRNA の探索を行い、その検証に向けたリアルタイム PCR の解析を実施し、発現制御に重要な microRNA 候補を挙げる事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y	4. 巻 62
2. 論文標題 Migration of lymphatic endothelial cells and lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Dev Biol	6. 最初と最後の頁 293-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.170218yt	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuji Taya, Kaori Sato, Youichi Shirako, Yuuichi Soeno
2. 発表標題 Craniofacial lymphatic vessels are formed by endothelial cells migrated from truncal cardinal veins
3. 学会等名 Society for Developmental Biology 78th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田谷雄二、佐々木康成、堀江哲郎、佐藤かおり、添野雄一
2. 発表標題 マウス顎顔面発生における舌下神経軸索と舌筋細胞系譜との相互作用
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Taya, Yasunori Sasaki, Tetsuro Horie, Kaori Sato, Yuuichi Soeno
2. 発表標題 How can the hypoglossal neuroaxis elongate to tongue muscle in mice?
3. 学会等名 令和元年度日本歯科大学歯学会第6回ウィンターミーティング
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Taya, Kaori Sato, Youichi Shirako, Yuuichi Soeno
2. 発表標題 How are lymphatic vessels formed in the oral region of embryos?
3. 学会等名 令和元年度日本歯科大学歯学会大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y
2. 発表標題 Lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice Migration of lymphatic endothelial cells from cardinal veins into mandibular arches
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田谷雄二, 佐藤かおり, 白子要一, 添野雄一
2. 発表標題 マウス顎顔面領域へのリンパ管内皮細胞の移住とリンパ管形成
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirako Y, Taya Y, Sato K, Soeno Y
2. 発表標題 Lymphangiogenic dynamics in oral cancer microenvironment
3. 学会等名 平成29年度日本歯科大学歯学会第4回ウィンターミーティング
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taya Y, Sasaki Y, Sato K, Soeno Y
2. 発表標題 Molecular switches of differentiation from myogenic progenitors into myoblasts and satellite cells in the mouse developing tongue
3. 学会等名 Society for Developmental Biology 77th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taya Y, Sasaki Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y
2. 発表標題 Tongue morphogenesis through epithelial-mesenchymal interaction in mouse embryos
3. 学会等名 18th International Congress of Developmental Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taya Y, Sasaki Y, Sato K, Soeno Y
2. 発表標題 Tongue myogenic cell differentiation regulated by Nfix and its related factors in embryonic mice
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 添野雄一, 佐藤かおり	4. 発行年 2017年
2. 出版社 キタ・メディア	5. 総ページ数 114
3. 書名 改訂 最新口腔病理学の整理 問題解説形式チェックノート	

1. 著者名 佐藤かおり(分担執筆), 高木實 監修, 高田隆・豊澤悟 編集	4. 発行年 2018年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 380
3. 書名 口腔病理アトラス 第3版	

1. 著者名 佐藤かおり, 田谷雄二, 白子要一, 添野雄一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 キタメディア	5. 総ページ数 115
3. 書名 ポイントレビュー病理学・口腔病理学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本歯科大学病理学講座HP http://www.ndu.ac.jp/~pathome/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田谷 雄二 (TAYA YUJI) (30197587)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	白子 要一 (SHIRAKO YUICHI) (50756377)	日本歯科大学・生命歯学部・助教 (32667)	削除：2019年3月8日
研究分担者	添野 雄一 (SOENO YUUICHI) (70350139)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関