

令和 6 年 5 月 2 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20990

研究課題名（和文）歯周組織における創傷治癒時のリンパ管の役割

研究課題名（英文）The function of lymphatic vessels in periodontal tissue repair

研究代表者

松本 修治（Matsumoto, Shuji）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90965279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では歯周組織修復におけるリンパ管の機能を明らかにすることを目指しました。まずリンパ管特異的蛍光レポーターマウスに絹糸結紮による歯周炎を誘導後、絹糸を除去し、歯周組織修復時のリンパ管の動態を三次元的に解析したところ、リンパ管ネットワークがより密に分布することが明らかとなりました。さらにリンパ管内皮細胞（LEC）に特異的な増殖因子であるVEGF-C局所投与により、歯周組織再生が亢進することが明らかとなりました。またマウス歯肉由来LECの初代培養に成功し、同細胞にVEGF-C刺激後、RNA-seq解析を行った結果、VEGF-Cが歯肉LECのアポトーシス経路に関与していることが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な組織においてリンパ管ネットワークの再構築が組織損傷後の正常な治癒を促進することが示されています。しかしながら正常歯周組織におけるリンパ管の三次元的なネットワークや創傷治癒過程におけるリンパ管の再構築およびその機能について明らかになっていませんでした。本研究では歯周組織においてリンパ管ネットワークを3次元的に描出することに成功し、創傷治癒過程におけるリンパ管の役割について重要な知見を得ました。本研究の成果はリンパ管新生の制御による組織修復の促進を目指す、新規歯周組織再生療法の開発につながる基盤情報となるものと考えます。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the function of lymphatic vessels in periodontal tissue repair. First, we used ligature-induced periodontitis in lymphatic vessel-specific fluorescent reporter mice and analyzed the 3-D dynamics of lymphatic vessels after removing the ligature. We found that the lymphatic vessel network was more densely distributed during the repair. Furthermore, local injection of VEGF-C, a growth factor specific to lymphatic endothelial cells (LECs), enhanced periodontal tissue repair. In addition, primary cultures of gingival LECs from mice were successfully established, and RNA-seq analysis of these cells after VEGF-C stimulation suggested that VEGF-C is involved in the apoptotic pathway of gingival LECs.

研究分野：periodontology

キーワード：歯周組織 リンパ管

1．研究開始当初の背景

脊椎動物には血管系とリンパ管系の二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、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リンパ管を經由して末梢組織から運搬され、血液循環系に合流します。リンパ管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ましたが、最近になって、損傷を受けた様々な組織の修復過程において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ました。例えば、リンパ管が液性因子を放出することで心筋の成長・修復を促進すること（Liu *et al.*, *Nature*, 2020）や、リンパ管が皮膚幹細胞の機能を制御することで皮膚再生に寄与していること（Gur-Cohen *et al.*, *Science*, 2019）が報告され、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ます。歯周組織においても、リンパ管が存在していることは免疫染色により示されてきました（Ushijima *et al.*, *Arch. Oral Biol.*, 2008）。また、歯肉リンパ管が組織液バランス維持に重要な役割を演じていることが報告（Mkonyi *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010）され、他組織同様に歯周組織においても組織液の調整の役割を担っていると考えられます。また歯周炎マウスモデルにおいては、VEGF-C を介して組織におけるリンパ管が密に分布する（Mkonyi *et al.*, *J. Dent. Res.*, 2012）と報告されており、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という報告（Mkonyi *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2012）等から、リンパ管が歯周炎の病態形成にも重要な役割を果たしていることが示唆されています。これらより、歯肉にリンパ管が存在し、炎症歯周組織ではより密なネットワークが構築されることが明らかとなっています。しかしながら、歯周組織が修復される過程でリンパ管が果たす役割についてはほとんど検討されていません。また、このような生体組織の機能を詳細に理解するためには、脈管・神経のネットワークに代表されるような組織内の細胞同士の連携を、連続性を保って観察する必要があると考えました。

2．研究の目的

本研究では、リンパ管蛍光レポーターマウスと組織透明化技術による三次元イメージングを活用し、歯周組織修復におけるリンパ管の機能を *in vivo* で明らかにすることを目指しました。加えて、リンパ管増生に関与すると言われている血管内皮増殖因子 C（VEGF-C）を用いて、歯肉由来リンパ管内皮細胞（LEC）を対象とした *in vitro* 解析を行い、リンパ管新生の制御による組織修復の促進を目指す、新規歯周組織再生療法の開発につながる基盤情報を得ることを目的としました。

3．研究の方法

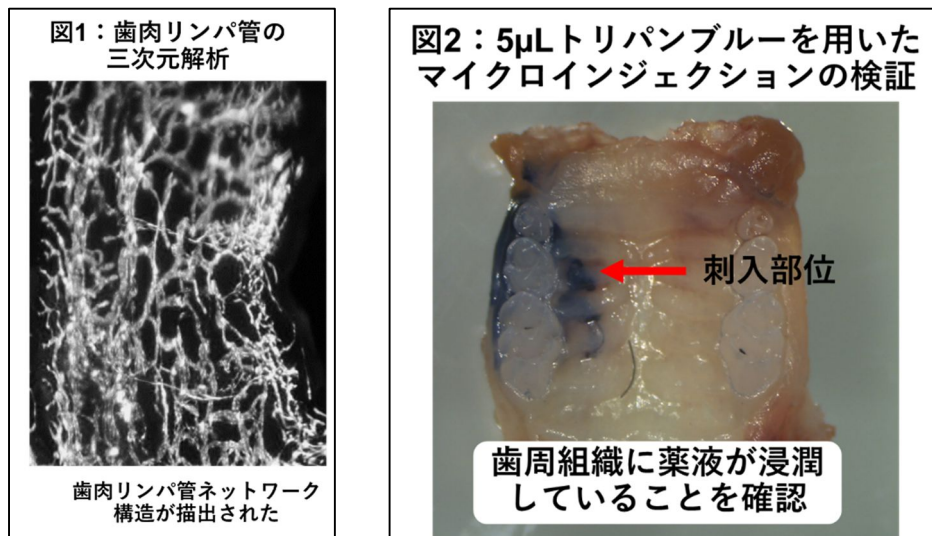
本研究では、リンパ管が歯周組織修復過程にどのように影響しているのかについて、リンパ管特異的蛍光レポーターマウスを用いて従来の組織切片を用いた観察法や透明化技術を歯周組織に応用した新規観察法による *in vivo* 解析、さらにマウス歯肉由来初代培養 LEC の樹立および同細胞をもちいた *in vitro* の解析を行いました。

4．研究成果

（1）歯周組織リンパ管の *in vivo* 解析

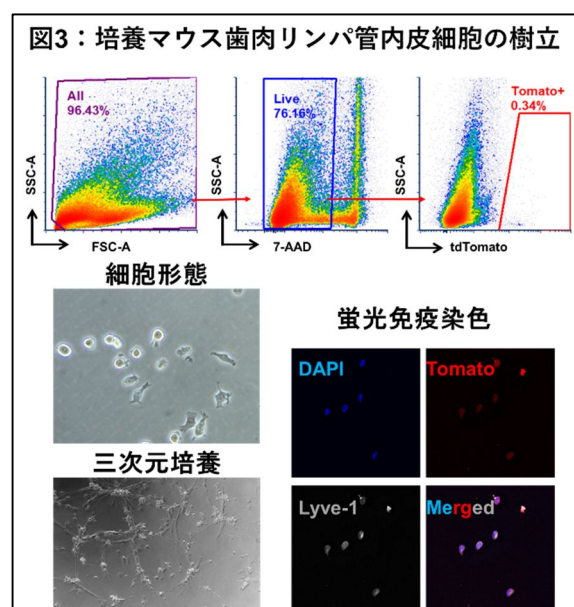
まずリンパ管蛍光レポーターマウス（Prox1-tdTomato マウス）と組織透明化技術を用いて、正常歯肉に密なリンパ管ネットワークが存在することを明らかにしました。さらに同マウスの上顎両側の第二臼歯に 7 日間絹糸結紮を行った後、絹糸を除去し、再生過程におけるリンパ管ネットワークを検討したところ、無処置群よりも密にリンパ管が分布することを明らかにしました。

た（図 1）。ついで、歯周組織にマイクロインジェクションにより薬剤を局所投与する方法を確立しました（図 2：トリパンブルーを用いた薬剤の局所浸潤の検証結果）。同手法を用いて、絹糸除去後の歯周組織に VEGF-C の局所投与を行うことで、歯周組織修復時のリンパ管が与える影響を検討したところ、VEGF-C 投与群で統計学的に有意な歯槽骨再生量の増加が認められました。



（2）歯肉 LEC の *in vitro* 解析

これまで歯肉由来 LEC を樹立した報告はなく、*in vitro* における機能解析を目的に、Prox1-tdTomato マウスを活用し、LEC の初代培養を試みました。Prox1-tdTomato マウスの歯肉から Tomato 陽性細胞をセルソーターにて分取し、血管内皮細胞専用培地で培養しました。同細胞はリンパ管内皮細胞マーカーである Lyve-1 を発現するのみならず、三次元培養することで管状構造を示すことを確認しました（図 3）。さらに VEGF-C 刺激により培養歯肉 LEC がどのような挙動を示すかについて RNA-seq 解析を行いました。VEGF-C により多くの遺伝子変動が認められ、GO 解析により、VEGF-C は歯肉 LEC のアポトーシス経路を制御していることが示唆されました。



以上、本研究では、歯周組織においてリンパ管ネットワークを三次元的に描出することに成功し、創傷治癒過程におけるリンパ管の役割について重要な知見を得ました。本研究の成果はリンパ管新生の制御による組織修復の促進を目指す、新規歯周組織再生療法の開発につながる基盤情報となるものと考えられます。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 松本 修治，岩山 智明，富田 貴和子，岩下 瑞穂，パーン ポンサティアン，阪下 裕美，竹立 匡秀，村上 伸也
2．発表標題 リンパ管新生誘導による歯周組織修復促進
3．学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4．発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------