

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791783

研究課題名（和文） 顎関節滑膜における線維芽細胞様 B 型細胞の分類確立～筋特異的分子に着目して～

研究課題名（英文） Morphological characterization of type B synoviocytes in the temporomandibular joint focusing on expression of the muscle specific proteins

研究代表者

井上 佳世子（野澤 佳世子）(NOZAWA-INOUE KAYOKO)

新潟大学・医歯学系・特任准教授

研究者番号：90303130

研究成果の概要（和文）：顎関節において、円滑な顎運動に必要な滑液の成分を分泌すると言われる滑膜細胞は、線維芽細胞様 B 型細胞と総称される。しかしながら、B 型細胞は多様な形態を示し、異なる機能をもつ細胞が混在していると推測される。本研究ではラット顎関節の一部の B 型細胞が筋特異的に発現するタンパクであるデスミンとカベオリン-3 を有することを発見し、免疫細胞化学的特徴から筋分化傾向は持たず、血管形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Fibroblast-like type B synoviocytes (type B cells) in the temporomandibular joint (TMJ) are heterogeneous in their morphology and immunoreactivity. This study revealed that some of the type B cells expressed desmin, a muscle-specific intermediate filament, in adult rat TMJ. Immunocytochemical characteristics of the desmin-positive type B cell suggested that this cell does not have myogenic or contractile ability. In addition, their immunoreaction patterns and ultrastructures resembled those of a precursor of a capillary pericyte during angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：顎関節，滑膜，滑膜表層細胞，筋

1. 研究開始当初の背景

顎関節は滑膜性の関節であり、その関節腔に面する滑膜の表層にはマクロファージ様 A 型細胞と線維芽細胞様 B 型細胞という 2 種類の滑膜表層細胞が上皮様に配列している。そのうち B 型細胞は滑液の成分を産生すると言われ、円滑な顎運動において重要な役割を担う。研究代表者は 25kD 熱ショックタンパク (Heat Shock Protein: HSP25) が線維芽

細胞様 B 型細胞の特異的マーカーとなることを見出し、これを用いて観察した B 型細胞の多様な形態からは、分泌機能以外にも滑膜-関節腔間のバリアーや、滑液成分のセンサー、機械受容など様々な機能をもつことが推測された。また、B 型細胞の細胞膜にカベオリンタンパクを有するカベオラが多数存在することも明らかにした。カベオリンは多くの細胞に存在するカベオリン-1 (Cav1) と筋の

みに分布するカベオリン-3 (Cav3) に分類され、ラット顎関節滑膜の B 型細胞は Cav1 免疫陽性を示し、そのうち一部の細胞が Cav3 も合わせ持っていた。平滑筋や心筋では Cav1 と Cav3 が共存し、特に Cav3 はそれらの細胞分化に関わることが知られている。発育過程のラット顎関節滑膜を用いた代表者の所見でも Cav3 免疫陽性の B 型細胞は、陰性の細胞に比べて細胞内小器官が発達しており、また HSP25 と Cav3 が共存する B 型細胞と、片方のみ発現する細胞が存在していたことから、これらのタンパクの発現が B 型細胞の分化段階、あるいは機能の違いを反映していると推測した。しかしながら、B 型細胞の分化過程や発生学的由来は未だ不明であり、B 型細胞と総称される中に、由来も機能も異なる細胞が混在している可能性が十分に考えられた。

関節リウマチの患者において、滑膜表層細胞が平滑筋アクチン (α -smooth muscle actin: α -SMA) を発現することが報告され、筋線維芽細胞様細胞と名付けられている。関節炎の重篤度と筋線維芽細胞様細胞の増加との関係が注目されているものの、この細胞の由来や機能は明らかにされていない。筋線維芽細胞の存在は、いくつかの器官で提唱されており、その分化や維持には機械的伸展が関与すると言われている。顎関節滑膜は顎運動による機械的刺激を常に受けており、代表者が発見した筋特異的な Cav3 陽性 B 型細胞が筋線維芽細胞様細胞へと分化あるいは脱分化することが想像できた。これらのことから、B 型細胞と総称される細胞を筋特異的分子の発現に着目して新たに分類し、その由来および機能を考察することが顎関節滑膜の正常構造の理解のみならず、顎関節疾患における病態を理解する上で役立つと考えた。

2. 研究の目的

本研究では正常な顎関節滑膜の線維芽細胞様 B 型細胞における筋特異的分子・筋分化調節因子・筋分化抑制因子の局在を明らかにする。次いで免疫電顕法を用いた微細構造学的検索を行い、加えて滑膜の発育段階におけるそれらの変化を明らかにする。研究代表者のこれまでの研究成果である B 型細胞のタンパク発現の多様性と合わせて、その機能を考察し、B 型細胞の生物学的分類を試みる。

3. 研究の方法

(1) 滑膜表層における筋特異的分子の検索

8 週齢雄性ラットを腹腔麻酔下にて灌流固定し、顎関節を一塊として取り出した後、クリオスタットにて脱灰凍結切片を作成した。骨格筋あるいは平滑筋に特異的なデスミン、平滑筋アクチン、アクチン結合蛋白 (カルポニン、カルデスモン等)、筋分化調節因

子 (myogenin, MyoD, Myf5, MRF4)、筋分化抑制因子 (myostatin) に対する抗体を用いて、滑膜表層における局在を免疫細胞化学的に検索した。A 型細胞と B 型細胞を標識する ED1 抗体、HSP25 抗体と二重免疫染色することにより、光顕下にて陽性細胞の同定を行った。また B 型細胞の一部に発現することが既知のカベオリン-3 との共存についても検討した。標本は高解像度デジタルカメラを装着した顕微鏡にて撮影、画像解析用コンピュータに直接入力し、陽性細胞の分布を観察するとともに、解析装置を用いて定量化した。

(2) 電顕的免疫細胞化学的検索

免疫染色を行った切片を樹脂包埋し、免疫陽性反応を示した B 型細胞の微細構造学的特徴について検討した。

(3) 滑膜発生段階における発現変化

B 型細胞が出現する胎生 21 日以降の滑膜において、筋特異的タンパクの発現を同様に検索した。

(4) デスミン陽性 B 型細胞の免疫細胞化学的検討

(1)~(3)の結果 (詳細は研究成果にて後述)、B 型細胞のうちデスミンを発現している細胞の血管新生への関与が推測されたため、特にこの細胞に着目して観察を行うとともに、血管周皮細胞、内皮細胞の標識抗体を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

8 週齢ラット顎関節滑膜において、筋分化の初期段階に発現するデスミンの免疫陽性反応が表層細胞に認められた。免疫電顕法による微細構造学的観察および HSP25 抗体との二重免疫染色によって B 型細胞の一種であることが明らかになった (下図)。

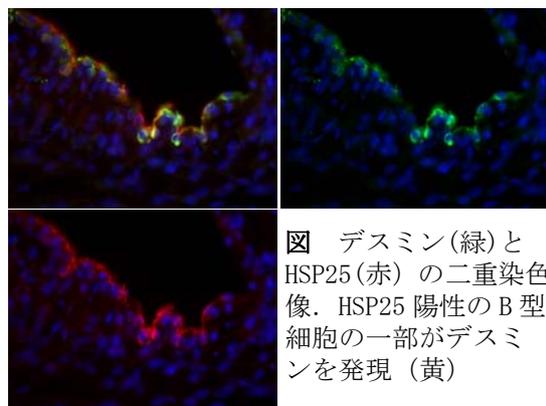


図 デスミン(緑)と HSP25(赤)の二重染色像. HSP25 陽性の B 型細胞の一部がデスミンを発現(黄)

また筋特異的カベオリンである Cav3 はデスミン陽性細胞の一部に共存していた。しかしながら、B 型細胞はデスミンに続いて筋分化

を促す調節因子は陰性であり、筋の収縮に関与する平滑筋アクチンや、アクチン結合蛋白にも微弱な免疫反応を示すのみであった。さらにデスミンは細胞骨格となる中間系フィラメントのうち、筋特異的な構築タンパクとされているため、デスミン以外の中間系フィラメントの局在も検索したところ、デスミン陽性細胞のほとんどは間葉系細胞がもつビメンチンを有していたが、未分化細胞がもつネスチンとは共存しなかった。

発育過程の滑膜においては、デスミン陽性反応は B 型細胞が出現する時期には存在し、表層細胞の総数増加とともに陽性細胞も増加する傾向にあった。

免疫電顕法を用いてデスミン陽性 B 型細胞を観察すると、近傍には微小な管腔構造とマクロファージ様細胞である A 型細胞が常に存在しており、上述した免疫細胞化学的特徴と、これまでに明らかにしてきたタンパクの発現様式も合わせると、血管新生時に管腔形成に先立って出現する血管周皮細胞の前駆細胞に類似していることに気がついた。そのため周皮細胞を標識する NG2 (Neuron-gial 2) の局在を検索したところ、デスミン陽性 B 型細胞の細胞膜に発現が認められた。

デスミン陽性細胞の免疫組織学的特徴

| | | |
|-----------------------|---------------------------|-----|
| デスミン Desmin | 筋分化初期の細胞の標識、筋特異的中間径フィラメント | |
| Heat shock protein 25 | 線維芽細胞様 B 型細胞の標識 | +++ |
| Caveolin-1 | 多くの細胞の細胞膜カベオラ構築タンパク | +++ |
| Caveolin-3 | 筋の細胞膜カベオラ構築タンパク | ++ |
| α-smooth muscle actin | 平滑筋アクチン、収縮能の指標 | +/- |
| Caldesmon | カルモデュリン結合タンパク、収縮能の指標 | +/- |
| Myogenin | 筋分化制御因子 | - |
| MyoD | 筋分化制御因子 | - |
| Vimentin | 間葉系細胞の中間径フィラメント | ++ |
| Nestin | 未分化細胞に発現する中間径フィラメント | - |
| NG2 | 血管周皮細胞の標識 | +++ |
| ED1 | マクロファージ様 A 型細胞の標識 | - |

デスミン陽性細胞の全てが強陽性：+++、大多数が強陽性：++、大多数が弱陽性+、一部が弱陽性：+/-、全てが陰性：-

本研究の結果から B 型細胞と総称される中には筋特異的タンパクであるデスミンを有する分化した特殊な B 型細胞が存在し、その細胞は筋分化傾向や収縮能はもたず、血管形成に関与している可能性が示唆された。

(2) 国内外における位置付けとインパクト

整形外科領域の関節の膨大な基礎研究データに比べ、顎関節滑膜の表層細胞を対象とした研究はほとんどなされていない。顎関節滑膜は、整形外科領域の滑膜とは異なり、神経堤由来の細胞によって構成されている可能性が高く、その発生時期、発生様式も四肢の関節とは異なるため、四肢のデータを顎関節に当てはめることはできない。しかしながら顎関節においては滑膜炎が初発症状となるリウマチの罹患率が低いことから、滑膜は注目されない状況にある。本研究の B 型細胞におけるデスミンの発現は国内外で初めての発見であり、整形外科領域においても報告はない。本研究結果である新たな特徴をもつ滑膜表層細胞の発見は、顎関節滑膜の研究の基礎的データとなるだけでなく、整形外科領域の研究発展をも促す効果をもつ。

(3) 今後の展望

顎関節滑膜表層、すなわち関節腔に面する領域には有窓性の内皮細胞をもつ毛細血管が多数存在し、そこから滑液の液体成分が作り出されている。顎関節における血管の研究は、関節円板の血管分布を対象としたものが多く、滑膜表層の毛細血管網についての研究は見あたらない。

一般的に、既存の毛細血管から新たな血管が分枝する血管新生は、思春期以降には特定部位を除いて見られないとされる。一方、創傷治癒過程や腫瘍組織、関節リウマチの滑膜には血管新生が起これ、疾患の重篤度を左右する。本研究で見出したデスミン陽性 B 型細胞が、血管周皮細胞の前駆細胞あるいは血管新生に先立って離脱した周皮細胞であるとすれば、正常滑膜において生理的血管新生が生じていることになり、新たな発見となる。今後、血管周皮細胞に特異的な分子および血管新生に関連する因子等に注目して探究し、これまで蓄積してきたデータと合わせて、更なる滑膜表層 B 型細胞の細分類確立を目指す。

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 1 件)

- ① Jin Magara, Kayoko Nozawa-Inoue (corresponding author), Akiko Suzuki, Yoshiro Kawano, Kazuhiro Ono, Shuichi

Nomura, Takeyasu Maeda: Alterations in intermediate filaments expression in disc cells from the rat temporomandibular joint following exposure to continuous compressive force, Journal of Anatomy, 印刷中, 2012, 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 野澤-井上佳世子, ラット顎関節におけるデスミン陽性B型表層細胞, 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2011年10月1日, 長良川国際会議場, 岐阜.
- ② 真柄 仁, ラット顎関節への機械的負荷による関節円板におけるデスミンの発現, 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2011年10月1日, 長良川国際会議場, 岐阜.
- ③ 野澤-井上佳世子, ラット顎関節におけるデスミン陽性B型滑膜表層細胞の免疫細胞化学的特徴, 第116回日本解剖学会全国学術集会, 2011年3月30日, 東北地方太平洋沖地震のため集会は中止. Journal of Physiological Sciences 誌による誌上開催となった.
- ④ Kayoko Nozawa-Inoue, Phenotypic desmin-positive type B synoviocytes in the rat temporomandibular joint, 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010年7月15日, Barcelona Convention Center, Barcelona, Spain.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 佳世子 (野澤 佳世子)

(NOZAWA-INOUE KAYOKO)

新潟大学・医歯学系・特任准教授

研究者番号: 90303130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし