

平成 21年 4月 6日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18791346

研究課題名（和文） 顎関節滑膜表層細胞におけるカベオラの存在意義

研究課題名（英文） The functional significance of caveolae in the synovial lining cells of the temporomandibular joint

研究代表者

井上 佳世子（野澤 佳世子）(NOZAWA-INOUE KAYOKO)

新潟大学・歯学系・特任准教授

研究者番号：90303130

研究成果の概要：顎関節滑膜の線維芽細胞様 B 型細胞は滑液の成分を分泌し、円滑な顎運動のために重要であるが、その正常構造や由来には不明な点が多い。本研究では研究代表者が発見してきた B 型細胞の標識物質を使い、B 型細胞の表面にカベオラが存在し、そこに筋特異的なカベオリン-3 タンパクが発現していることを明らかにした。その発育段階における発現変化を検討し、カベオリン-3 が B 型細胞の増殖ではなく分化に関与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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，表層細胞，カベオラ，カベオリン

1. 研究開始当初の背景

関節滑膜の滑膜表層細胞は、滑液の産生・分泌・吸収に関わり、マクロファージ様 A 型細胞と線維芽細胞様 B 型細胞の 2 つに大別される。このうち特に B 型細胞の細胞生物学的な特徴には不明な点が多く残されている。研究代表者は本研究を開始する以前から、顎関節滑膜表層 B 型細胞について形態学的研究を継続しており、様々なタンパク (Heat shock protein 25, ラミニン等) が B 型細胞のマーカーとなることを発見してきた。B 型細胞の細胞膜にはタコ壺様の構造が存在することが知られていたが、これらのマーカーを使う

ことにより、この構造物がカベオリン-1 を有するカベオラであることを明らかにしていた。カベオラの主要タンパクであるカベオリンには 3 つのサブタイプが存在し、多くの細胞に存在するカベオリン-1、-2 と筋のみに分布するカベオリン-3 に分類される。カベオリン-1 は血管内皮細胞において一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) の活性を抑制し、また顎関節症患者の滑膜に NOS が発現することから、カベオリン-1 の顎関節症への関与が想像できた。カベオリンと NOS との関与を免疫細胞化学的、微細構造学的、分子生物学的に詳細に検討することは、顎関

節滑膜表層細胞におけるカベオラの機能的意義だけでなく、正常構造の理解、顎関節症の病態の理解、治療法の開発にも役立つと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、免疫組織化学的手法、分子生物学的手法、電子顕微鏡法を用いて、顎関節滑膜の滑膜表層細胞における各サブタイプのカベオリンとNOSについて、それらの発現ならびに細胞内局在を明らかにする。さらに、発生段階におけるカベオラ構造の形成とカベオリンおよびNOSの変動を検討する。これらの実験、観察を行うことにより、顎関節滑膜表層細胞におけるカベオラの存在意義を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 滑膜表層細胞におけるカベオリンファミリーの同定

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、急速凍結しクリオスタットにて脱灰凍結切片を作成した。抗カベオリン-1, 2, 3抗体を用いて、顎関節滑膜におけるカベオリントンパクのサブタイプの局在を免疫細胞化学法により検索した。この際、表層細胞のマーカー(ED1, Hsp25)も合わせて用い、二重免疫染色することにより、光線顕微鏡的細胞型の同定を行った。免疫染色した標本は高解像度デジタルカメラを装着した画像処理用コンピュータに直接入力し、正常顎関節滑膜表層細胞におけるこれらのタンパクの分布を観察し、画像解析装置を用いて定量化を行った。免疫染色を行った切片を樹脂包埋し、陽性反応を示す微細構造学的特徴について免疫電顕法を用いて検討した。

(2) 滑膜表層細胞におけるNOSの検索

成熟ラット顎関節滑膜におけるNOSのすべてのサブタイプ(血管型 eNOS・神経型 nNOS・誘導型 iNOS)の局在を免疫細胞化学的、電顕的免疫細胞化学的に検索した。さらにNOSの抗リン酸化抗体も用いた。免疫染色を行った切片を樹脂包埋して免疫電顕法を用いて検討するとともに、カベオリンとの二重免疫染色を行った。

(3) 発生段階の滑膜表層細胞におけるカベオリンファミリーおよびNOSの発現変化の検索

生後0, 3, 5, 7, 14, 21日目のラットを用いた。成熟ラットと同様に灌流固定、脱灰の後、顎関節部のみ取り出し矢状断連続凍結切片を作成した。(1)と同様の各種抗体を用い、免疫組織化学的手法にてその発現時期、および局在変化を検索した。また、多重染色にて

種々のタンパクの共存についても検討した。

各日齢で免疫染色を行った切片を樹脂包埋し、免疫電顕法により表層細胞の微細構造学的変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

成熟ラット顎関節滑膜表層B型細胞の細胞膜カベオラにはカベオリン-1だけでなくカベオリン-2と筋特異的なカベオリン-3も局在していた(論文②)。カベオリン-1や-2が表層細胞以外の血管内皮細胞や線維芽細胞、軟骨細胞の一部にも発現していたのとは対照的に、カベオリン-3は滑膜最表層のB型細胞にのみ限局しており、他の細胞には全く免疫陽性反応が認められなかった(図1)。さらには、ほとんどのB型細胞(Hsp25免疫陽性を示す)はカベオリン-1陽性のカベオラを有していたのに対し、一部のB型細胞はカベオリン-3を欠いていた。カベオリン-3免疫陽性のB型細胞は免疫陰性の細胞に比べて細胞内小器官が発達していた(図2)。

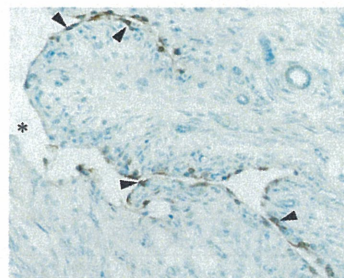


図1. カベオリン-3免疫陽性細胞(矢頭)が滑膜表層に存在する。

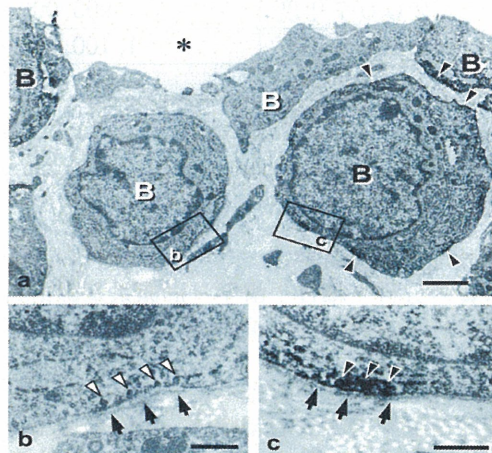


図2. カベオリン-3免疫陽性(B)と陰性(B̄) B型細胞の免疫電顕像。b, cは各々のカベオラ拡大像。

平滑筋では細胞分化にカベオリン-3が関与しているという報告があり、本研究のカベオリン-3の免疫活性の発現もB型細胞の分化段階を反映している可能性が示唆された。

次に、成熟ラット顎関節滑膜表層細胞において、NOSの発現について試薬、試料を変えて繰り返し検討したが、すべてのサブタイプ

が免疫組織化学的に検出されなかった。カベオリン-1は *in vivo* で直接誘導型 NOS の発現を抑制する、という報告が過去にあることから B 型細胞のカベオリン-1 が NOS の発現を抑制しているのかもしれない。

生後発育過程のラット顎関節滑膜においては(論文①), Hsp25 免疫陽性を示す未分化な B 型細胞が生後 1 日目で出現することが、これまでの研究で明らかとなっている。カベオリン-1 を発現するカベオラを持つ B 型細胞は生後 5 日目には存在していた(図 3)。カベオリン-3 免疫陽性の B 型細胞は、それに遅れて生後 14 日目に出現し、8 週間までは増加する傾向にあった(図 4, 表 1)。

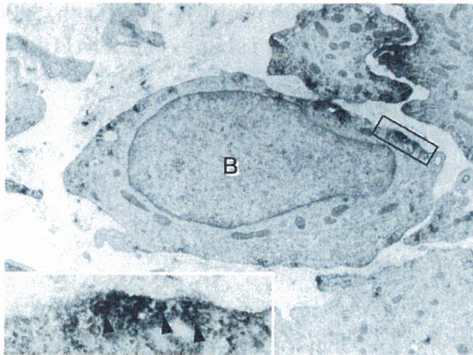


図 3. 生後 5 日のカベオリン-1 免疫陽性 B 型細胞 (B) の免疫電顕像。枠内はカベオラ (矢頭) 拡大像。

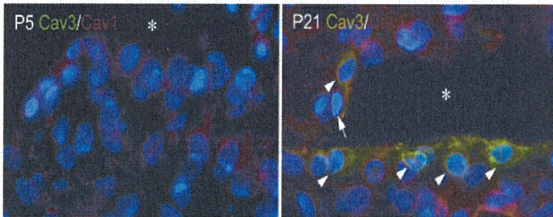


図 4. 生後 5 日 (左) と 21 日 (右) のカベオリン-1 (赤) /-3 (緑) 二重染色像。共陽性を示す細胞 (矢頭) とカベオリン-1 のみ陽性の細胞 (矢印) が滑膜表層に並ぶ。

日齢	3	5	7	14	21	28
Hsp25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cav1	-	+	+	+++	+++	++
Cav3	-	-	-	±	++	+

表 1 カベオリン (Cav) の B 型細胞における発現変化。
-, 免疫陽性反応無し; +/-, 50-60% の B 型細胞が弱い免疫陽性反応; +, 80-90 % の B 型細胞が弱い反応; ++, 80-90 % の B 型細胞に強陽性反応; +++, すべての B 型細胞が強陽性

ラットの切歯は生後 14 日頃に咬合を確立し、その後、臼歯の咬合確立へと進むため、カベオリン-3 発現への咬合力の影響がうかがわれた。また、カベオリン-3 免疫陽性 B 型

細胞が出現する時期は、滑膜表層細胞層が形成された後であること、さらに陽性細胞の細胞内小器官が免疫陰性の細胞に比べて発達していたことから、カベオリン-3 が B 型細胞の増殖ではなく、分化に関与していると考えられた。

一方で、成熟ラット顎関節滑膜表層に筋分化開始の調節を担うとされるデスミンが局在することを光顕レベルで発見した。デスミン免疫陽性細胞および B 型細胞のマーカーである HSP25 陽性細胞はカベオリン-3 免疫陽性細胞に比べて数が多い傾向にあった。このことからカベオリン-3 はある一定の分化段階の B 型細胞のみを標識していることが明らかとなった。

B 型細胞の発生学的由来は未だ不明であるが、未分化な B 型細胞が胎生期の間葉系細胞中に出現するという報告があることから、本研究結果および科学研究費補助金を受けておこなった以前の研究結果を合わせ、間葉系の細胞から直接分化した線維芽細胞様 B 型細胞が滑膜表層細胞層内で成熟、増殖すると考えられた。

(2) 国内外における位置付けとインパクト

顎関節滑膜表層細胞の中でも、特に線維芽細胞様 B 型細胞は、その形態から滑膜-滑液間のバリアーや、滑液成分のモニターとして機能することが予測されており、その特徴、動態、機能を知ることは顎関節疾患の原因解明に必須である。しかしながら、これまでの研究は B 型細胞のマーカーが確立されていなかったために、細胞同定の面で不明な点を多く残してきた。カベオリン-3 は研究代表者がこれまでに見出してきたマーカーのうちでも、一定の分化段階の B 型細胞のみを標識する特異的なマーカーであり、B 型細胞の正常構造や機能の検討や、顎関節滑膜炎の病態把握にも役立つと確信している。また、顎関節のみならず、整形外科領域でも B 型細胞におけるカベオリン-3 発現に関する研究は着手されていない。すなわち、本研究結果に加えて、これを基に *in vivo* で滑膜表層細胞の構造と変化を検討する研究は、顎関節に限らず整形外科領域においても、有効な基礎データの収集を可能にするものである。

(3) 今後の展望

近年、整形外科領域では関節リウマチの患者の滑膜において、滑膜表層細胞が平滑筋アクチンを発現していることが報告され、これを筋線維芽細胞様細胞と名付けている。この細胞の増加と関節炎の重篤度には正の相関があるため注目されているものの、そ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、関節以外のいくつかの器官でも提唱されており、局所の環境を調節す

る因子の分泌や、器官の発生・恒常性維持、腫瘍形成などに重要な役割をもつとされている。しかしながら、顎関節においては筋線維芽細胞様細胞の存在すら明らかにされていない。また、筋線維芽細胞の分化や維持には機械的伸展が関与するとされる。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、本研究で見出した筋特異的なカベオリン-3 免疫陽性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可能性は容易に想像できる。今後はこれまでの研究成果の蓄積を基に、新たに筋分化関連因子のB型細胞における発現を検索することにより、様々な特徴を示すB型細胞の形態学的分類確立を目指すとともに、炎症とB型細胞との関連についてもさらに詳細に探究していく。

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)

- ① Masahiro Niwano, Kayoko Nozawa-Inoue, Akiko Suzuki, Nobuyuki Ikeda, Ritsuo Takagi, Takeyasu Maeda : Immunocytochemical localization of caveolin-3 in the synoviocytes of the rat temporomandibular joint during development, *Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(3): 233-242, 2008, 査読有.
- ② Kayoko Nozawa-Inoue, Akiko Suzuki, Masahiro Niwano, Yoshiro Kawano, Takeyasu Maeda: The expression of caveolin-3 in the fibroblast-like type B synoviocytes in the rat temporomandibular joint, *Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(3): 238-242, 2007, 査読有.

[学会発表] (計6件)

- ① 野澤-井上佳世子, ラット顎関節滑膜表層B型細胞におけるデスミンの局在, 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008年9月25日, TOC有明コンベンションホール, 東京.
- ② Kayoko Nozawa-Inoue, Expression of muscle-specific desmin in the rat temporomandibular joint synoviocytes, 2008年7月3日, Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada.
- ③ 庭野将広, ラット顎関節滑膜表層細胞の発達過程における筋特異型カベオリン-3タンパクの発現, 第20回日本顎関節学会総会・学術大会, 2007年7月15日,

仙台国際センター, 仙台.

- ④ Niwano M, Expression of caveolin-3 in rat TMJ synoviocytes during development, 85th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2007年3月23日, New Orleans, LA.
- ⑤ 野澤-井上佳世子, ラット顎関節におけるカベオリンファミリー蛋白の局在, 第48回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2006年9月23日, 横浜.
- ⑥ Kayoko Nozawa-Inoue, Caveolin-1, -2, and -3 in the rat temporomandibular joint. 84th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2006年6月28日, Brisbane, Australia.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

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 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: