

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890074  
 研究課題名（和文） 顎関節滑膜表層細胞と破骨細胞の細胞学的相同性の解明をめざして  
 研究課題名（英文） An immunohistochemical study of the similarity between the synovial lining cells in the temporomandibular joint and osteoclasts.  
 研究代表者  
 鈴木 晶子 (SUZUKI AKIKO)  
 新潟大学・医歯学系・特任助教  
 研究者番号：70509538

研究成果の概要（和文）：顎関節における炎症性疾患の病態の主体となる滑膜表層細胞と破骨細胞には caveolin-3 が発現する。両細胞に共通したイオンチャネルや受容体の存在を検索することを目的として、成獣ラット顎関節において特異抗体を用いた免疫組織学的検索を行った。破骨細胞では T 型、L 型、N 型電位依存性カルシウムイオンチャネルや ENaC が、滑膜表層細胞では T 型チャネルや ENaC が発現しており、これらはカルシウムシグナリングやイオン濃度変化に対する恒常性の維持に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Synovial lining cells and osteoclasts, which play an important role in the exacerbation of inflammatory diseases in the temporomandibular joint (TMJ), express caveolin-3 in their caveolae. The caveolae are involved in various cellular functions through ion channels and receptors. The present study examined the expression of the ne ion channels or receptors in both these cells of the rat TMJ by immunohistochemical techniques. The osteoclasts expressed T, L, and N type voltage-sensitive calcium channels and ENaC, and some of the synovial lining cells also expressed the T type channel and ENaC. The results suggest that these channels are concerned with calcium dependent signal cascades or maintaining their homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：顎関節・滑膜表層細胞・破骨細胞・イオンチャネル・カベオラ

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節疾患における病態の主体は、関節腔内面を被覆する滑膜、下顎頭表層の関節

軟骨および関節腔に二分する関節円板であり、その特徴は滑膜の増殖、軟骨・骨吸収、関節円板の穿孔である。四肢関節の代表で

ある膝関節と比較してリウマチ性関節炎や変形性関節症が少ないのに対し、顎関節特有の顎関節症がほとんどを占めるのも特徴である。

顎関節滑膜表層細胞はマクロファージ様 A 型細胞と線維芽細胞様 B 型細胞に分類される。カベオラ構造の発達、細胞接着因子 CD44 の発現、ヒアルロン酸の産生と分泌など多様な特徴を持つ線維芽細胞様 B 型細胞は炎症時において重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、骨吸収の主体である破骨細胞にも、CD44 の発現と細胞骨格アクチンへの結合を介した細胞移動が報告されており、炎症時の滑膜細胞と破骨細胞の移動や接着に CD44 が関与する可能性が推測される。また、リウマチ性関節炎の滑膜細胞には、破骨細胞増殖因子である RANKL が発現しており、由来の異なる両細胞の相互作用と相同性が炎症の増悪や発症に関与していることが示唆された。

シグナル伝達や物質の取り込み・分泌に重要な場である細胞膜構造のカベオラの構成タンパク caveolin は、膜の陥入の構築だけでなく様々なレセプターや細胞骨格と結合しており、細胞の恒常性と形態の維持、シアーストレスセンサーとして重要な因子である。滑膜表層 B 型細胞には caveolin-1, -2, -3 が、破骨細胞には caveolin-3 が発現している。筋特異的 caveolin-3 が両細胞に発現していることは、骨吸収時に増加する細胞外カルシウムイオン濃度への反応と細胞内へのシグナル伝達を制御するチャンネルの発現にこの caveolin-3 の存在が関与していることが想像された。

## 2. 研究の目的

高い反応性と分化増殖活性を有する破骨細胞においては、イオンチャンネルを介した細胞制御機構および骨吸収活性の制御機構の存在が知られているが、滑膜表層細胞におけるイオンチャンネルの研究はほとんどされていない。特に両細胞に共通して存在するカベオラにはイオンチャンネルや受容体が集積し、シグナル伝達と細胞接着の場として重要な構成であると指摘されている。本研究では、顎関節症やリウマチ性関節炎の発症と増悪の主体である破骨細胞と滑膜表層細胞に共通して発現するイオンチャンネルや受容体に着目して両者の類似性を探ることにより、顎関節疾患における骨吸収での相互作用と細胞の活性化の解明を免疫組織化学的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

滑膜表層細胞および破骨細胞におけるイ

オンチャンネルタンパク、カルシウム結合タンパクの免疫細胞化学的検索：

雄性 8 週齢 Wistar 系ラットの顎関節および膝関節を試料として用いた。アルデヒド系固定液で灌流固定後、顎関節部および膝関節部を採取し、EDTA にて脱灰を行った。それぞれの関節においてパラフィン切片または凍結切片を作成し、目的のチャンネルや受容体に対する特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。一部の免疫染色試料は樹脂包埋し、電子顕微鏡観察をした。

## 4. 研究成果

筋組織における Caveoli-3 の局在は、筋小胞体であり、神経終末からの刺激や筋細胞の興奮によりカルシウムイオンの放出と取り込みが行われる。これには、筋膜や筋小胞体に存在する電位依存性カルシウムチャンネルが重要な役割を果たしている。電位依存性カルシウムチャンネルは、 $\alpha 1$ 、 $\beta$ 、 $\alpha 2\delta$  の 3 サブユニットからなり、イオンが通過する孔を形成する  $\alpha 1$  サブユニットで分類される。細胞外のカルシウムイオン濃度変化が激しく、さらに caveolin-3 を発現する破骨細胞を検索した所、高域値活性型で神経組織や筋組織に広く存在する L 型チャンネル Cav 2, 1 ( $\alpha 1C$ ) は、骨梁に接する破骨細胞だけでなく遊走中の細胞や単核の前破骨細胞と考えられる細胞などすべての TRAP 陽性破骨細胞の細胞全体に陽性反応を認めた (図 1)。

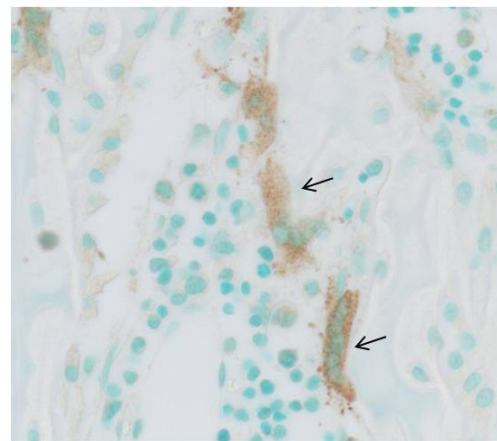


図1:Cav 1.2陽性破骨細胞

また中枢および末梢神経の神経細胞の神経終末に局在し、神経伝達物質の放出の調整に関与するとされる N 型チャンネル Cav 2, 2 ( $\alpha 1B$ ) は骨梁に接する細胞の波状縁にのみ陽性反応を示した (図 2、3)。

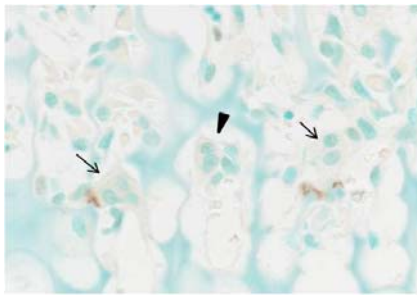


図2: Cav 2.2陽性(矢印)と陰性(矢尻)の破骨細胞

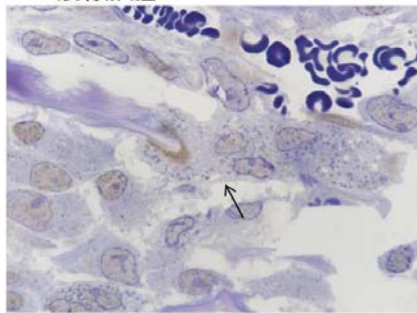


図3: Cav 2.2陽性破骨細胞が骨梁を取り囲む像

低閾値活性型の T 型チャンネル Cav 3.2 ( $\alpha 1H$ ) は、骨梁に接する破骨細胞が陽性を示し (図 4 A)、特に骨幹部皮質骨の外側で、筋との接合部に存在する大きな吸収窩を形成している破骨細胞では波状縁に沿って強陽性反応が認められた (図 4 B)。Cav 3.2 は機械受容に関与するチャンネルと考えられており、筋収縮による骨への刺激がリモデリングや骨量の維持に重要であることを考えると、このチャンネルがリモデリングの起点となる骨吸収に関与する可能性も考えられる。

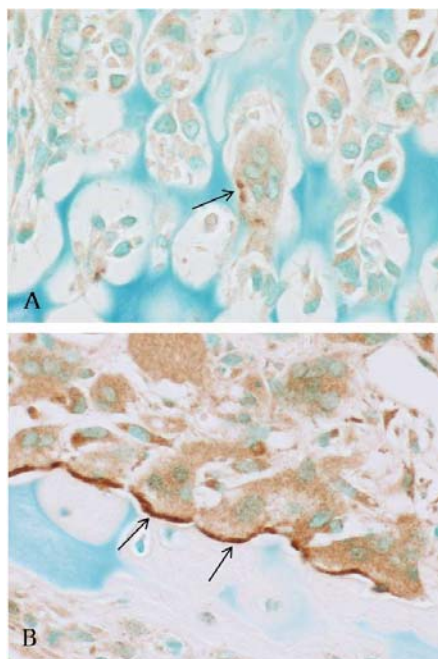


図4: Cav 3.2陽性破骨細胞

骨吸収の場である波状縁は、溶解された骨基質からのカルシウムイオンが細胞内に取り込まれ、他の細胞膜周囲より細胞外カルシウムイオン濃度も高い。破骨細胞の活性化および骨基質の分解と吸収の制御に関与するサイトカインの産生と分泌の制御に Cav 2.2 や Cav 3.2 チャンネルからのカルシウムシグナリングが関与する可能性が考えられる。顎関節の関節頭に存在する破骨細胞と膝関節の脛骨に存在する破骨細胞を比較したところ、本研究で検索したイオンチャンネルの発現パターンは同様であった。しかし、免疫陽性反応は脛骨の方が下顎頭より強陽性を示す細胞が多く、常に加わる負荷の違いが破骨細胞の活性度や分化度に少なからず影響していることが示唆された。一方、滑膜組織においては、Cav 3.2 で関節腔を覆うように細胞質突起を伸ばす細胞の一部に明瞭な陽性反応を認めたが、他のチャンネルでは明らかな陽性反応は認められなかった (図 5)。

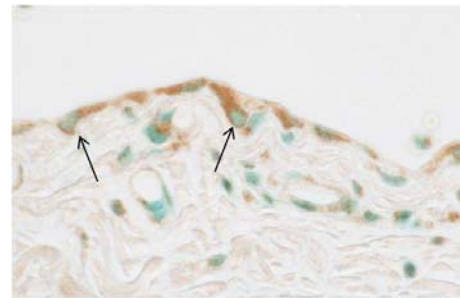


図5: 滑膜表層細胞層における Cav 3.2 免疫染色像

電位依存性カルシウムチャンネルは、細胞膜の脱分極により活性化が起こり細胞外からカルシウムイオンが流入する。この膜の脱分極を生じる機構の 1 つにナトリウムイオンチャンネルによる細胞外からのナトリウムイオンの流入がある。滑膜表層細胞と破骨細胞は、常に血漿成分に由来する滑液や血漿に接しており、ナトリウムイオン濃度の変化は細胞の恒常性や活動を刺激する要因となる。これまで、 $Na^+/H^+$  exchanger や電位依存性ナトリウムチャンネル Nav 1.6 の破骨細胞での存在が報告されている。そこで、カベオラに存在し、caveolin により制御を受けると考えられているナトリウムチャンネル群 DIG/ENaC ファミリーの ENaC の両細胞における発現を検索した。ENaC は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  のサブユニットが 4 量体を形成するリガンド依存性ナトリウムチャンネルである。破骨細胞においては、ENaC  $\beta$  と  $\gamma$  がほぼすべての細胞で陽性反応を認め、特に ENaC  $\gamma$  は骨梁に面する破骨細胞で強い反応を示した。

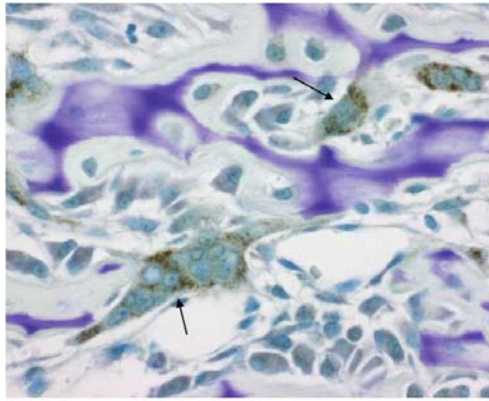


図6: ENaC  $\gamma$  陽性を示す破骨細胞

滑膜表層細胞では、ENaC  $\beta$  と  $\gamma$  で強陽性を示す細胞と陽性反応を示さない細胞が混在していた。ENaC  $\alpha$  については、どちらの破骨細胞も滑膜表層細胞も陰性かごくわずかな陽性反応を示す程度であった。

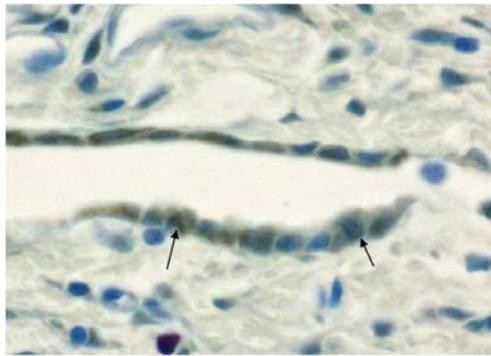


図7: 滑膜表層細胞層における ENaC  $\gamma$  免疫陽性細胞(矢印)と陰性細胞

ENaC は、ナトリウムイオンの移動に伴う水分子の移動や細胞形態・大きさの変化にも関与することが示唆されている。また、神経細胞においては機械的刺激の受容チャネルでもある。細胞外ナトリウムイオン変化に対する細胞の恒常性維持以外の役割として、破骨細胞が広く細胞質突起を伸ばして骨面に接着したり、滑膜表層細胞の一部は関節腔内面を覆う長い突起を有するなど細胞形態を大きく変化させる時や過剰な負荷による細胞の活性化にも関与する可能性が示唆された。

## 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 3 件)

- ① Hitomi Y, Suzuki A, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Inoue M, Maeda T.

Immunohistochemical detection of ENaC beta in the terminal Schwann cells associated with the periodontal Ruffini endings of the rat incisor. Biomed Res., 30(2): 113-119, 2009. 査読有。

- ② Iizuka N\*, Suzuki A\*, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Nandasena BGTL, Okiji T, Maeda T. Differential cell-specific localization of Cav-1 and Ca<sup>2+</sup>-ATPase in terminal Schwann cells and mechanoreceptive Ruffini endings in the periodontal ligament of the rat incisor. J. Anat., 214(2): 267-274, 2009. 査読有。(\*Equally contribution)
- ③ Saito S\*, Suzuki A\*, nozawa-Inoue K, Kawano Y, Hoshino M, Saito C, Maeda T. Immunohistochemical detection of nestin in the periodontal Ruffini endings of the rat incisor. Neurosci. Lett., 449: 195-200, 2009. 査読有。(\*Equally contribution)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 鈴木晶子、顎関節関節円板の発達におけるネスチンと GFAP の局在変化、第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010 年 3 月 27-30 日、岩手県。
- ② 鈴木晶子、ラット顎関節滑膜の発達におけるネスチンの発現、第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009 年 3 月 27-30 日、岡山県。

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 晶子 (SUZUKI AKIKO)  
新潟大学・医歯学系・特任助教  
研究者番号：70509538