

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25年4月30日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592207

研究課題名（和文） 顎関節関節腔形成における血管系の役割

研究課題名（英文） Involvement of vascular elements in formation of articular cavity in temporomandibular joint

研究代表者

小野 和宏 (ONO KAZUHIRO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40224266

研究成果の概要（和文）：

上関節腔の形成は下関節腔形成に先行して始まり、関節腔形成予定領域では胎生 18 日目に ED1 陽性マクロファージの貪食より間葉細胞間が拡大されて裂隙形成が生じて、上関節腔が形成された。一方、下関節腔の形成は胎生 19 日目に関節頭表層に沿った CD31 陽性毛細血管の進入により、関節円板原基と下顎頭の間の組織が押し広げられ、生後直後から始まる顎運動と同時期に生じる毛細血管の消失により形成された。

研究成果の概要（英文）：

The upper articular cavity formation had begun in advance of the lower cavitation. In the area of the prospective upper articular cavity, the phagocytosis by ED1-positive macrophages expanded the intercellular spaces of mesenchymal cells to form the cleft between the temporal bone and articular disk at embryonic day 18. On the other hand, the CD31-positive endothelial cells were restricted to the lower cavity-forming area at embryonic day 19 to spread out the tissue between mandibular condylar and articular disk, and diminished thereafter. The appearance of ED1-reactive macrophages and temporal vascularization play crucial roles in the upper and lower articular cavity formation, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎関節、関節腔、発生、血管

1. 研究開始当初の背景

顎関節は人体で唯一の両側性関節であり、咀嚼運動の重要な構成要素である。近年、顎関節症の患者は急増しており、この病態の解明、治療法の確立は歯科医学の大きな課題と

なっている。顎関節症の病態の解明には、顎関節の正常構造の理解が不可欠であるが、四肢の関節の研究に比べ、その解明は非常に遅れている。その理由として、組織標本作製が困難であるという技術的な問題ならびに顎

関節構成要素の特異的なマーカー物質の欠如があげられる(Nozawa-Inoue et al., 1999, 2003)。顎関節症の病態の解明には顎関節の正常組織像の理解に加え、発生学的所見の蓄積が不可欠である。一方、四肢の関節の発生に関する研究に比べ、顎関節に関する研究は非常に少ない。これまで、顎関節の発生に関する研究は、単に関節ならびにその構成要素の形成時期に関するものがほとんどで (Mérida-Velasco ら(1993)、Morimoto ら(1994)、形成機構を検索したものは皆無である。特に関節腔の形成に関して四肢の関節でもさまざまな仮説が提出されているが、確立された説は全くないにもかかわらず、四肢の関節と同様であると長年信じられてきた。しかしながら、顎関節は系統発生学的に新しい関節であること、さらに二次関節として発生するので、四肢の関節で得られた所見をそのまま顎関節に当てはめて考えることは危険である。実際、関節腔の形成は非常に遅いこと (Ikeda et al., 2004)、DNA の断片化が見られないこと(Matsuda et al., 1997)、四肢の関節では報告されていない関節腔形成予定領域に毛細血管が進入する(Ohnuki, 2000)ことが示されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は免疫組織化学的・微細構造学的手法ならびに分子生物学的手法を用いて顎関節関節腔形成過程における血管系の役割を明らかにすることにより、顎関節の生物学的特性の解明することである。

3. 研究の方法

ヒト顎関節の構造や機能が比較的近いラット顎関節を研究対象とし、顎関節腔形成機構を解明するため、経日的にラット顎関節の発生過程を追求した。

(1) 細胞動態の解明として、25 kDa の熱ショックタンパク (Hsp25) 抗体と ED1 抗体を用いた光線顕微鏡的、電子顕微鏡的免疫細胞化学を用いた。なお、これらの抗体は滑膜 B 型細胞、マクロファージおよび滑膜 A 型細胞を認識する。また、アポトーシスの関与の有無を検討するため、TUNEL 法を用いた。さらに、毛細血管の関与を検討するため、血管内皮細胞を CD31 抗体の免疫染色ならびに墨汁注入標本を作成した。

(2) 上顎関節腔形成過程におけるマクロファージの役割、特に細胞の断片の処理と遊走、移動、接着過程を明らかにするため、CD44 の局在を抗 CD44 モノクローナル抗体による免疫染色にて検討した。一部の免疫染色した切片は樹脂包埋し、透過電子顕微鏡にて CD44 陽性細胞の微細構造を観察した。さらに滑膜細胞のマーカー (A 型細胞: ED1 抗体、B 型細胞:

Hsp25 抗体) と CD44 抗体との蛍光 2 重染色を行った。これらの局在の変化を経日的に実施した。さらに、ヒアルロン酸結合タンパク (HA-binding protein; HABP) の組織化学を用いてヒアルロン酸の結合領域を検索した。

(3) 顎関節腔形成過程における咀嚼運動の関与を明らかにする目的で、胎生 19 日齢のラット胎仔を摘出し、下顎を不動化した状態で全胎仔培養を行い、関節腔形成過程を組織学的に検索した。

(4) 関節円板は、上下関節腔形成とともに始まり咬合確立までその発達が続く。Hsp25 の発現に加えて細胞機能と分化段階によって発現の種類が変化する細胞内骨格の中間径フィラメントに着目し、生後の発達過程および成熟した円板構成細胞の詳細な分類を行った。神経膠細胞に主として発現する Glial fibrillary acidic protein (GFAP) と神経上皮細胞や筋線維芽細胞や線維芽細胞様細胞、未分化細胞に発現するネスチンは、頭部神経堤細胞 (CNCC) から分化する関節円板の発生過程を追跡するのに有効であると考え、この GFAP およびネスチンの局在変化と陽性細胞の細胞学的特徴を免疫細胞化学的に検索した。

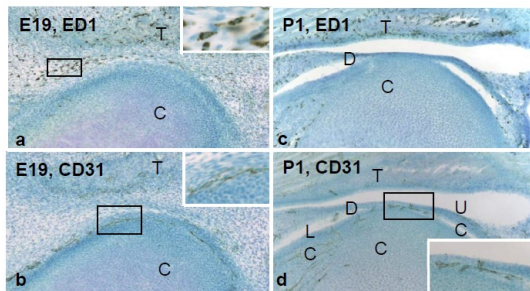
(5) 機械的負荷を付与した際の顎関節関節円板の変化を追求した *in vivo* 実験では、ラット顎関節後部組織に持続的な圧迫力を加え、組織発生中に発現パターンが大きく変化することが知られている中間径フィラメントの発現変化を追求した。特に、血管平滑筋や周皮細胞のマーカーである α -smooth muscle actin と筋特異的中间径フィラメントであるデスミンとの関係に着目した。

4. 研究成果

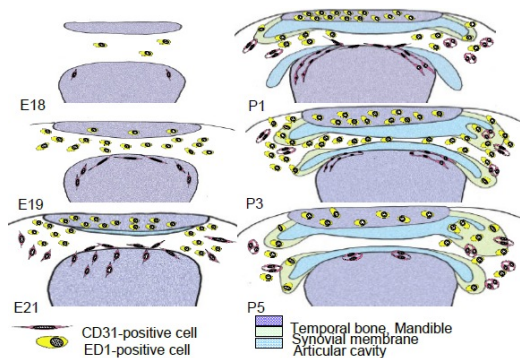
(1) ラットの上顎関節腔は胎生 21 日目に開始され、生後 1 日目で完成し、その後、下顎関節腔が生後 1 日目から開始され、生後 3 日目に形成が終了した。胎生 19 日に上顎関節腔形成予定部位である側頭骨と関節円板原基の間に多数の ED1 陽性マクロファージが存在したが (図 a)、CD31 陽性血管内皮細胞は存在せず、CD31 陽性細胞は下顎頭原基表層に沿って、下顎関節腔形成予定部位にのみ配列していた (図 b)。胎生 21 日目では、形成開始した上顎関節腔の周囲に ED1 陽性マクロファージが局在したが、下顎関節腔形成予定部位には確認できなかった。上顎関節腔の形成が終了した生後 1 日目以降、ED1 陽性マクロファージは滑膜内に遊走し (図 c)、5 日目までには滑膜表層細胞層を形成していた。一方、下顎関節腔形成開始とともに、CD31 陽性血管内皮細胞は下顎頭と関節円板の連結部位にのみ残存し (図 d)、

生後3日目以降、滑膜の毛細血管と下顎頭線維層の血管にのみ CD31 陽性反応を認めた。これら血管系の分布の変化は墨汁注入標本の観察より確認された。アポトーシスによる細胞死の関節腔形成への関与を TUNEL 法により検討したが、関節腔形成予定部位に TUNEL 陽性細胞は観察されなかった。得られた所見を模式図に示したのが図2である。

<図1：顎関節発生過程における ED1, CD31 免疫反応の局在>

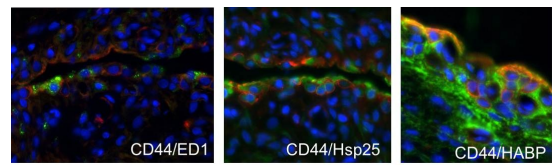


<図2：ラット顎関節腔形成過程における血管とマクロファージの分布の推移>

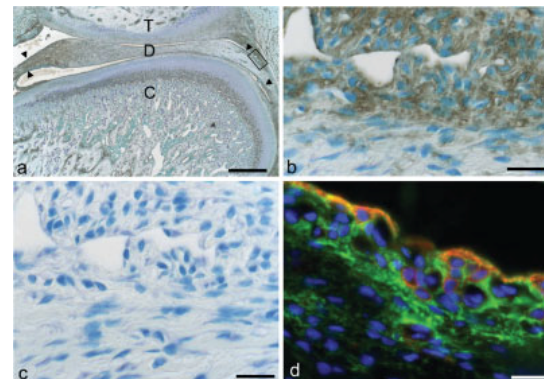


(2) OX50 抗体、ED1 抗体、Hsp25 抗体はそれぞれ、ラット CD44、マクロファージ様滑膜 A 細胞、線維芽細胞様滑膜 B 細胞の細胞標識マーカーである。OX50 陽性反応は関節腔を裏位置する部位に存在する細胞膜に観察された。二重染色結果 (図 3) により、また、免疫電顕観察によりこれらの細胞はカベオラを発達させていることから、OX50 陽性細胞は線維芽細胞様細胞である滑膜 B 細胞であることが明らかにされた。しかしながらマクロファージ様細胞である滑膜 A 細胞は OX50 免疫反応を欠いていた。また、HABP の反応は OX50 陽性および陰性の滑膜細胞周囲の細胞外基質に観察され、これらはメッシュ状の陽性を示したが、滑膜下層では非常に弱いシグナルであった (図 4)。この観察により、ヒアルロン酸が細胞外基質に豊富に存在することで、ヒアルロン酸接着因子である CD44 が B 型細胞の配列に関与することを、特異抗体を用いた免疫組織化学により明らかとなった。

<図3：ラット滑膜における CD44 と ED1、Hsp25、HABP との共存関係>



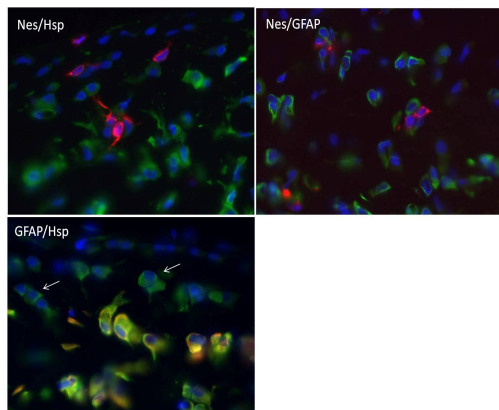
<図4：ラット滑膜における HABP の局在。C はコントロール切片、d は OX50 との二重染色像>



(3) In vitro 系による顎関節腔形成過程の追求実験では、胎生 15 日のマウスを深麻酔下で母獣から取り出し、器官培養を試みた。摘出したマウス胎仔は、摘出後、実態顕微鏡下で断頭、除脳、皮膚剥離後、酸素を飽和させた DEME 培地内で器官培養を行った。しかしながら、マウス胎仔頭部表面は発生が進んだものの、培養液の頻繁な交換、ローテーター回転速度の調整等、さまざまな工夫を凝らしたが、顎関節形成部位は筋肉組織が厚く、また骨組織を多く含んでいるため、発生が進まなかった。この結果はこれまで顎関節の器官培養が困難であったことを裏付けた。全胎仔培養法は成功しなかったが、下顎関節腔に一過性に侵入した毛細血管は顎関節運動開始時から消失することから、毛細血管消失と顎関節運動開始時には密接な関係があると考えられたが、その解明には別途の研究アプローチが必要であることが考えられた。

(4) HSP25、Nestin、GFAP の多重染色により、関節円板構成細胞は少なくとも 3 種 (Hsp25 (+)/Nestin (-)/GFAP (+); Hsp25 (+)/Nestin (-)/GFAP (-); and Hsp25 (-)/Nestin (+)/GFAP (-)) に分類できることを明らかにした (図 5)。また、これら GFAP 陽性細胞およびネスチン陽性細胞は切歯萌出—臼歯萌出—咬合完成の各段階で飛躍的に増加し、咬合力付加のような機械的刺激が円板の発達に重要であることが示唆された。

<図5：8週齢ラット顎関節円板におけるGFAP（緑）、ネスチン（赤）、Hsp25の共存関係>



(5) 実験群の下顎頭軟骨では細胞層構造の著しい乱れ、メタクロマジーの減少を、関節円板ではコラーゲンの染色性低下など、非生理的な負荷の影響を示す所見を認めた。実験群の関節円板内ではデスミン免疫陽性細胞が顕著に増加し、円板内の総細胞数に対する陽性細胞率も有意に高かった。ビメンチン、GFAPの免疫陽性細胞数には変化が生じず、このことから関節円板内の細胞が、機械的な負荷に対して細胞形態を維持するためにデスミンを反応性に発現した可能性が示唆された。またデスミン免疫陽性細胞は平滑筋アクチン陰性であり、これが血管周皮細胞の前駆細胞の特徴であることから、ストレスを受けた関節円板に血管形成を含めた治癒機転が生じている可能性が考えられた。

(6) 研究成果のまとめ

- ・上関節腔形成は下関節腔形成に先行して始まり、側頭骨と関節円板原基の間の関節腔形成予定領域に侵入し、ED1陽性マクロファージの貪食より間葉細胞間が拡大されて裂隙形成が生じる(E18)。

- ・下関節腔形成は関節頭表層に沿ったCD31陽性血管内皮細胞で標識される毛細血管の進入により(E19)関節円板原基と下顎頭の間の組織が押し広げられ、生後直後から始まる顎運動と同時期に生じる毛細血管の消失により裂隙形成が生じる。

- ・顎関節では関節腔形成時の細胞減少や組織間隙の拡大にTUNEL陽性を示すアポトーシスが関与しない。

これらの知見は四肢関節では示されておらず、顎関節の特異的な一面を明らかにした。さらに顎関節の形成が出生直前(ラット胎生19日)から出生直後(生後3日)の短期間に起こること、発生様式の異なる側頭骨と下顎骨の関節頭およびその間に挟まれる関節円板の形成がほぼ同時に起こるといった特殊な発生機構を示した。

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2件)

1. Magara J, Nozawa-Inoue K, Suzuki A, Kawano Y, Ono K, Nomura S, Maeda T: Alterations in intermediate filaments expression in disc cells from the rat temporomandibular joint following exposure to continuous compressive force. *J. Anatomy*, 220(6): 612-621, 2012 (査読あり).

10.1111/j.1469-7580.2012.01501.x.

2. Miyako H, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Magara J, Kawano Y, Ono K, Maeda T: Phenotypes of articular disc cells in the rat temporomandibular joint as demonstrated by immunohistochemistry for nestin and GFAP. *J. Anatomy*, 219(4): 472-480, 2011 (査読あり).

10.1111/j.1469-7580.2011.01404.x

[学会発表] (計4件)

1. 真柄 仁, 野澤-井上佳世子, 鈴木晶子, 河野芳朗, 野村修一, 前田健康: 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, 岐阜, 2011. 9. 30-10. 2, 歯科基礎医学会雑誌, 53(Suppl.): 151, 2011.

2. 真柄 仁, 野澤-井上佳世子, 鈴木晶子, 河野芳朗, 野村修一, 前田健康: 機械的負荷を与えたラット顎関節関節円板におけるデスミンの発現. 平成23年度新潟歯学会総会, 新潟, 2011. 4. 16, 新潟歯学会雑誌, 41(1): 52-53, 2011.

3. 都 仁, 鈴木晶子, 野澤-井上佳世子, 真柄 仁, 前田健康: 顎関節関節円板の発達におけるネスチンおよびGFAPの局在変化. 平成22年度新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2010. 11. 13, 新潟歯学会雑誌, 40(1): 96, 2010.

4. 真柄 仁, 野澤-井上佳世子, 野村修一, 前田健康: 機械的ストレスを与えたラット顎関節関節円板におけるデスミンの発現. 第119回日本補綴歯科学会学術大会, 東京, 2010. 6. 11-13, プログラム・抄録集: 212, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/anatomy2/anatomy2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 和宏 (ONO KAZUHIRO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40224266

(2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

鈴木 晶子 (SUZUKI AKIKO)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：70509538