

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592760

研究課題名(和文)顎関節滑膜表層細胞層におけるデスミン陽性B型細胞の血管新生への関与

研究課題名(英文) Immunocytochemical characterization of type B synoviocyte in the rat temporomandibular joint: Its possible participation in synovial vascularization

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜表層細胞の形態は多様性に富むものの、マクロファージ様の細胞はA型、その他は線維芽細胞様B型細胞と曖昧に分類されている。本研究では、血管新生時の血管周皮/内皮細胞に発現する分子のラット顎関節滑膜表層細胞における局在を検討した。デスミン陽性B型細胞は血管新生時に出現する活性化周皮細胞のマーカー陽性を示し、毛細血管や内皮細胞マーカー陽性のA型細胞と接していた。また、滑膜表層の血管端には未環流の内皮細胞が存在し、血管出芽端に存在するといわれるtip cellのマーカー陽性を示す細胞も局在していた。滑膜表層細胞と総称される細胞の一部は、滑膜の生理的血管新生に重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The synovial lining layer in the temporomandibular joint (TMJ) contains two types of synovial lining cells (SLC): a macrophage-like type A cell and fibroblast-like type B cell. The present study investigated the immunocytochemical characteristics of the SLC in adult rat TMJ, focusing on their possible participation in the synovial vasculature. The desmin-positive B cell resembles an activated pericyte during angiogenesis in both immunoreactivities and ultrastructure. They existed adjacent to the capillaries and RECA-1 (endothelial marker)-positive A cells. Lectin-perfusion represented the functional vessels in synovial membrane. Some capillaries with RECA-1-reaction lacked lectin-staining, indicating a loss of blood-circulation due to vessel sprouting. RECA-1 and desmin-positive SLC often attached to this portion. A few capillaries also expressed ninein (sprouting tip cell marker). These findings suggest that SLC might contribute to angiogenesis in the synovial membrane.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：顎関節 滑膜 滑膜表層細胞 血管

1. 研究開始当初の背景

顎関節は滑膜性の関節である。関節腔を裏打ちする滑膜は、関節腔を充たす滑液を産生し、円滑な顎運動に重要な役割を担う。正常な滑膜の最表層には滑膜表層細胞と呼ばれる2種類の細胞が存在し、マクロファージ様A型細胞と線維芽細胞様B型細胞に大別される。しかしながら、我々のラット顎関節滑膜を対象とした長年の微細構造学的観察において、それらの形態は多様性に富み、表層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。我々が発見したB型細胞の特異的マーカーである25kDa熱ショックタンパク(Heat shock protein; Hsp25)(Arch Histol Cytol 62: 483-491, 1999)を用い、B型細胞の免疫細胞学的特徴を検討したところ、B型細胞と分類され得るすべての細胞は、断続的な基底膜様構造物(Arch Oral Biol 44: 531-534, 1999)と、カベオリン1(Cav1)を発現する細胞膜カベオラを有していた(Anat Rec 288A: 8-12, 2006)が、そのカベオラに筋特異的カベオリン3(Cav3)も合わせて発現している細胞と、発現していない細胞が存在していた(Anat Rec 290: 238-242, 2007)。

関節リウマチに冒された滑膜には、筋線維芽細胞様細胞と呼ばれる由来不明の細胞が出現する。この細胞へ分化するのが、Cav3免疫陽性のB型細胞なのではないかと想定し、筋線維芽細胞のマーカーである平滑筋アクチン(SMA)を始めとした筋特異的分子に着目して検索した中で、一部のB型細胞に筋特異的中間径フィラメントであるデスミンの発現を見出し、その細胞膜にはCav3陽性反応が認められた。期待したSMAや筋特有の収縮能を示す分子は、わずかな免疫陽性反応を示すのみで、筋分化を促す調節因子(myogenin等)の発現も認められなかった。この正体不明のデスミン陽性B型細胞を透過型電子顕微鏡にて観察すると、免疫陰性のB型細胞に比べて分泌顆粒や細胞質突起が発達し、その近傍には毛細血管とマクロファージ様A型細胞が常に存在していた。このようなタンパク発現パターンや微細構造学的特徴をもつ細胞を他の組織で探したところ、血管新生時に出現する活性化周皮細胞に類似していることが分かった(Histol Histopathol 24: 909-969, 2009)。また、組織における血管新生時には、血管の出芽端に既存の血管から遊走する活性化した周皮細胞や、特殊な内皮細胞であるtip cellが存在し、それに加えてマクロファージが協働して管腔形成を誘導するといわれている。(Nature 465: 697-699, 2010)。これらの文献と我々のこれまでのデータを合わせ、デスミン陽性B型細胞は筋分化傾向をもつのではなく、血管新生に関与する活性化周皮細胞なのではないか、という仮説に至った。しかしながら、正常滑膜において血管新生が恒常的に生じているかどうかは不明である。

血管新生とは、既存の毛細血管から新たな血管が分岐する現象であり、思春期以降の生理的な血管新生は特定部位にしか見られないとされる。一方、創傷治癒過程や腫瘍では血管新生が生じ、組織の低酸素状態が誘因の一つとされる。また、皮膚では機械的伸展により血管増生することも報告されている。関節リウマチの滑膜には血管新生が起こり、疾患の重篤度を左右しているため、滑膜の血管に関する研究は、この病的な血管増加を抑制する創薬目的がほとんどである。顎関節を構成する関節軟骨の関節面や、関節円板中央狭窄部は血管を欠き、その栄養は滑液の拡散にたよっている。滑液の液体成分は滑膜の血管からの漏出が主体であり、我々の観察で滑膜表層に多数の有窓性の血管を認めている(Arch Histol Cytol 66: 289-306, 2003)。したがって、顎関節の関節面は低酸素状態に陥りやすく、さらに滑膜が顎運動による機械的刺激を繰り返し受けていることも考慮すれば、正常滑膜においても、緩やかな血管新生が生後も生じている可能性は十分にあると考えられる。しかしながら、滑膜表層における血管新生の有無や、毛細血管と近傍の表層細胞の関係については報告がなく、これを解明することは顎関節滑膜の正常構造の理解と、顎関節疾患の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、血管新生時の血管周皮/内皮細胞の相互作用に関わる分子に着目して、デスミン陽性B型細胞と、その近傍のA型細胞および血管内皮細胞における、それらの局在を明らかにし、表層細胞の細胞学的特徴をさらに明確にする。また、蛍光標識トマトレクチンの静注により、滑膜表層の機能血管を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元構築することで、滑膜表層の微細な血管網と表層細胞との関係を多重標識で観察する。この方法は眼球の網膜における血管新生実験に頻用されているが、滑膜では他の関節も含めて初めてとなる。さらに、成長途中の滑膜における血管形成も観察し、滑膜表層における生理的血管新生の有無、ならびに表層細胞との関係を考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血管新生時の周皮/内皮細胞の相互作用に関わる分子の局在

8週齢雄性ラットを深麻酔下にて4%パラホルムアルデヒド灌流固定、脱灰の後、顎関節の連続凍結切片を作成した。B型細胞に発現を確認済みである周皮細胞前駆細胞マーカーNG2、デスミン、Hsp25に加え(以下括弧内は受容体)、angiopoietin-1(Tie2)、VEGF-A, B, PlGF-1(Flk-1, Flt-1)、PDGF-AB, BB(PDGFR)等に対する抗体を用いて、B型細胞における局在を免疫細胞化学的に検索した。A型細胞を標識するED1

抗体と血管内皮細胞を標識する CD31 および RECA-1 抗体も合わせて検討した。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を試みた。

(2) 電顕的免疫細胞化学的検索

免疫陽性反応が認められた切片を，四酸化オスミウムにて後固定，脱水，樹脂包埋し，免疫陽性細胞の微細構造学的特徴について透過型電子顕微鏡（H-7650, 日立ハイテクフイルディング社）を用いて検討した。

(3) 滑膜表層における機能血管網の描出と周囲細胞の免疫組織化学

蛍光標識トマトレクチン（*Lycopersicon esculentum* Lectin, Vector 社）を用いて，文献（Am J Physiol Renal Physiol 300: F721-733, 2011 等）を参考にしてみた。深麻酔下にて，1.25 mg/kg 体重（1 mg/ml in PBS）のトマトレクチンをラットに静脈内投与し，5 分後に(1)と同様に灌流固定した。暗所で 4 週間脱灰後に作製した凍結切片に加え，灌流固定直後に円板と滑膜を周囲骨より実体顕微鏡下で剥離したホールマウント標本を作製した。

トマトレクチンは血流のある血管（機能血管）のみを染色するが，血管内皮細胞のマーカーとして用いられる CD31 や RECA-1 は，閉鎖端や新生端などの血流のない血管の内皮細胞にも発現する，滑膜表層の毛細血管において，CD31, RECA-1 陽性で，トマトレクチンには染まらない，つまり血流のない血管内皮細胞の有無を検索した。

加えて，デスミン陽性細胞および血管の発芽端に出現すると言われる tip cell の存在を，そのマーカーである ninein 抗体を用いて多重標識することにより確認した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss 社) を用い，血管網の立体構築を合わせて行った。

(4) 滑膜の発生過程における表層細胞の出現と血管形成

我々のこれまでの研究で，胎生 21 日目に滑膜表層 B 型細胞が，生後 3 日目に A 型細胞が出現したので（Anat Rec A 279: 623-635, 2004），胎生 19 日から経日的に標本作製し，上記の血管新生関連タンパクの局在を免疫細胞化学的に検索した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

成熟ラット顎関節滑膜のデスミン陽性 B 型細胞に，これまで発現を確認していた活性化周皮細胞のマーカーに加えて，新たに同マーカーである PDGFR の発現が認められた（図 1）。

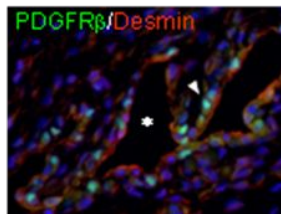


図 1 . PDGFR (緑) とデスミン (赤) の二重染色像 . 核染色 DAPI (青) . デスミン陽性表層細胞に PDGFR 陽性反応が共存している (矢尻) . * : 関節腔 .

血管腔を形成していない表層細胞にも，血管内皮細胞マーカーである RECA-1 免疫陽性反応を示す細胞が存在し，免疫電顕法によって，これがマクロファージ様 A 型細胞の一部であることが明らかとなった（図 2）。

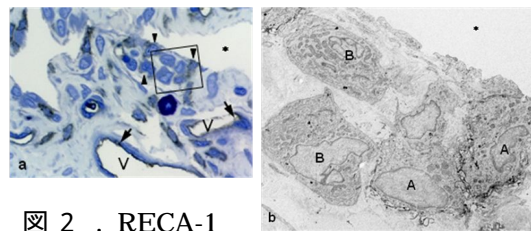


図 2 . RECA-1

免疫染色像 . 矢尻の陽性細胞は血管腔を形成しておらず，細胞膜表面の偽足様突起等の A 型表層細胞の特徴を呈している (A) . 多数の血管 (V) と B 型細胞 (B) も近接している .

トマトレクチンによる機能血管の生体染色後，通常の灌流固定と脱灰操作後に作成した硬組織標本においても，レクチン標識は明瞭に確認できた（図 3）。

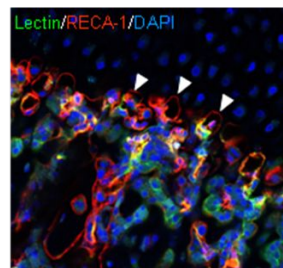


図 3 . レクチン (緑) , RECA-1 (赤) , 核染色 DAPI (青) . 下顎頭の骨・軟骨移行部において，軟骨へ侵入している新生血管の内皮細胞は RECA-1 陽性であるが，未環流のためレクチンには染まらない (矢尻) .

トマトレクチン染色後の標本で，血管網や滑膜表層細胞の形態ならびに互いの関係性を観察するには，ホールマウント標本よりも厚さ 35 ~ 45 μm の脱灰連続凍結切片が適していた。

関節腔に面している滑膜表層において，毛細血管となって密に分布する静注レクチンで標識された機能血管端には，RECA-1 陽性 A 型細胞が近接していた（図 4）. 同部ではデスミン陽性 B 型細胞が細胞質突起を多方向に伸ばし，その形態は腫瘍の血管新生における周皮細胞に類似していた。

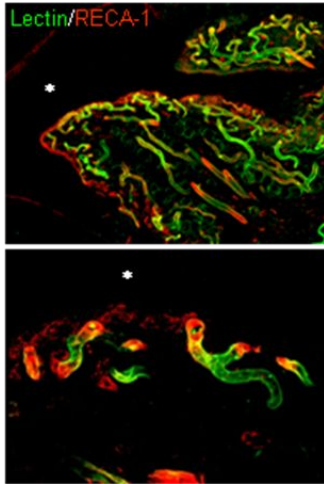


図4．レクチン（緑）、RECA-1（赤）.滑膜ヒダにおいて、レクチン標識された血管はヒダの中央部から表層に向かって分岐を繰り返して、表層で多数の毛細血管となって分布している。最表層の血管端は血流がないが、RECA-1 内皮細胞マーカー陽性

であり、血管新生の可能性が示唆される。RECA-1陽性A型細胞が血管端に接している。
*：関節腔。

レクチン標本において、血管新生端に出現する特殊な内皮細胞である tip cell のマーカーと二重染色を行ったところ、マーカーの1つである Ninein の陽性反応がレクチン標識された機能血管端にみられた（図5）。

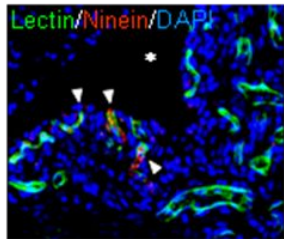


図5．レクチン（緑）、Ninein（赤）、核 DAPI（青）。滑膜表層のレクチン標識機能血管周囲に Ninein の陽性反応がみられる（矢尻）。

滑膜の発生過程における、血管形成と表層細胞の出現を検索した結果、胎生 21～生後 1 日の関節腔形成期に滑膜表層細胞層が明瞭化すると、血管形成に先立ってデスミン陽性 B 型および RECA-1 陽性 A 型細胞が出現した。生後 5 日目に関節腔が完成すると、RECA-1 陽性内皮細胞とデスミン陽性周皮細胞からなる毛細血管が滑膜表層に形成され、発育に伴って、これらの血管はデスミンあるいは RECA-1 陽性表層細胞を近傍に伴って増加していった。つまり、滑膜形成期の血管形成には、表層細胞が何らかの役割を担う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

本研究結果から顎関節滑膜の滑膜表層細胞と総称される細胞群に、滑膜の血管形成（新生）に関与する細胞が混在すること、加えて、正常な滑膜における血管新生の可能性が示唆された。一般的に、血管新生時には出芽端の tip cell と呼ばれる内皮細胞をマクロファージが引き寄せ、また出芽端の活性化した周皮細胞が既存の血管内皮細胞を誘導することから、滑膜表層において RECA-1 陽性 A 型細胞とデスミン陽性 B 型細胞の各々が、マクロファージと活性化周皮細胞の役割を

担い、ともに血管新生に関与していると推測される。リウマチ性関節炎における血管増生を抑制する研究が多数行われる中、正常な滑膜の血管新生と表層細胞に着目した研究は見当たらない。また、硬組織と軟組織からなる関節という構造において機能血管を観察するには、従来は墨汁や樹脂注入の標本が用いられていた。しかしながら、これらの方法では脱灰標本作製することが困難なため、関節を構成する骨や軟組織を *in vivo* の位置関係のまま、細胞単位で詳細に観察することは不可能で、血管分布の概観が得られるに過ぎなかった。本研究の蛍光標識トマトレクチンを用いた共焦点レーザー顕微鏡観察により、顎関節の全体像において、その血管分布が描出可能となり、特に関節円板中央狭窄部が無血管であること、滑膜表層に密集する微細な毛細血管網が、これまでの方法よりも格段に明瞭に観察できた。さらに、蛍光標識抗体を用いた多重染色も可能なため、幅広い用途に利用できる方法である。このレクチン生体染色を用いた脱灰標本作製は、顎関節のみならず、整形外科領域の他の観察でも報告がない。したがって、すべての関節滑膜における血管の研究に有用であるだけでなく、軟骨・骨内への血管侵入などの研究にも広く応用できると考える。

(3) 今後の展望

我々の過去のデータも合わせ、顎関節滑膜表層細胞と近傍の血管内皮細胞における血管新生誘導因子とその受容体の局在を引き続き検索する。本研究で確立したトマトレクチン静注脱灰標本を合わせて用いることで、血管新生と滑膜表層細胞との関係をさらに検討し、その結果から、多様な形態を呈する滑膜表層細胞の細分類や、新たな機能を今後も考察していく。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Nozawa-Inoue K, Harada F, Magara J, Ohazama A, Maeda T: Possible participation of synovial lining cells in vascularization in the rat temporomandibular joint. 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸国際会議場（兵庫県神戸市中央区）。

野澤・井上佳世子, 真柄 仁, 河野芳朗, 大峽 淳, 前田健康: ラット顎関節滑膜におけるデスミン免疫陽性 B 型および RECA-1 免

疫陽性 A 型表層細胞の血管形成への関与 .第
56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014
年 9 月 25- 27 日, 福岡国際会議場(福岡県福
岡市博多区).

Nozawa-Inoue K, Magara J, Harada F,
Terada-Nakaishi M, Kawano Y, Izumi K,
Maeda T: Possible participation of the
synovial lining cells in synovial
vascularization from rat
temporomandibular joint. The 3rd
International Symposium on Human
Resource Development towards Global
Initiative, 2013 年 12 月 20-22 日, Krabi
(Thailand).

Nozawa-Inoue K, Magara J, Terada M,
Kawano Y, Izumi K, Maeda T:
Immunocytochemical characterization of
type B synoviocyte in the rat
temporomandibular joint: Its possible
participation in synovial vascularization.
International Symposium on Human
Resource Development towards Global
Initiative, 2013 年 2 月 16-17 日, Cha-am
(Thailand).

〔図書〕(計 1 件)

野澤-井上佳世子, 前田健康: 第 8 章 III .
顎関節の発生 . 口腔組織・発生学 第 2 版(脇
田 稔, 前田健康, 中村浩彰, 網塚憲生編),
医歯薬出版, 東京, 2015 年, 363(246-252).

〔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 : 9 0 3 0 3 1 3 0

(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 : 4 0 1 8 3 9 4 1