

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890070

研究課題名(和文) 機械的負荷が顎関節円板内細胞に及ぼす影響 中間径フィラメントに着目して

研究課題名(英文) The effect of the exposure to continuous compressive force on disc cells in the temporomandibular joint- focusing on the intermediate filaments.

研究代表者

真柄 仁 (Magara, Jin)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90452060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：機械的負荷を与えた円板内で、電子顕微鏡にてデスミン陽性細胞の微細構造学的特徴について検討すると、これらの細胞は、大きな核を持つ大型の細胞で、細胞内小器官は疎であり、比較的分化度低い細胞と考えられた。デスミン陽性の突起状の細胞質を有しており、運動や遊走機能を持つと考えられた。また、陽性細胞の近傍には、微少な小血管の存在が認められた。免疫組織学的検討では、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)陽性細胞を、また、関節腔に接した円板の表層では、血管内皮細胞を標識するRECA-1陽性細胞が多数存在した。以上より、機械的負荷を与えた関節円板内では、血管新生を含めた円板の治癒機転が生じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ultrastructure of the desmin immunopositive disc cell following exposure to continuous compressive force was examined under electron microscope. Desmin-positive cells possessed comparatively large nucleus and sparse organelle in their cytoplasm, which means poorly-differentiated type. The articular disc cells showing desmin-immunoreactivity possessed cytoplasmic processes which had also immunoreactivity of desmin. This morphological feature indicated that desmin positive cells have moving and migration ability. In addition, around the desmin positive cells, some small blood vessels were observed. Immunohistochemical observation showed that a lot of articular disc cells were immunostained with VEGF (vascular endothelial growth factor) and some cells facing the articular cavity showed RECA-1 which is the antibody specific to vascular endothelium. In conclusion, there is a possibility that the formation of new vessels commenced in response to the extraordinary compressive force.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 補綴・理工系歯学

キーワード：メカニカルストレス 関節円板 中間系フィラメント デスミン

1. 研究開始当初の背景

顎関節の関節円板は円滑な顎運動を行う上で、重要な役割を担っている。顎関節症患者の多くに病理学的変化が認められる関節円板についての研究は、コラーゲンなどの細胞外基質に着目したものが多く、基質を分泌する円板内の細胞に関する報告はほとんどない。正常な関節円板においてさえも、細胞の名称すら統一されていない現状にある。申請者はこれまでに、顎関節に持続的な機械的負荷を与える動物実験モデルを確立し、下顎頭軟骨層における無細胞層の出現や、関節円板の細胞外基質および細胞の組織学的変化を報告してきた。

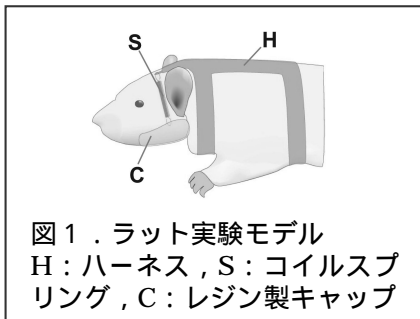
2. 研究の目的

本研究では、このモデルを用い未解明な点の多い関節円板内の細胞に関する免疫細胞化学的検討を行う。特に、細胞内骨格の構成成分でもあり、細胞の形質や分化度を反映する中間径フィラメントであるデスミンに着目して、機械的負荷による発現の変化を明らかにし、円板内の細胞の細胞生物学的特徴を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物としてヒトに比較的近い顎関節構造と機能を有するラットを用い、申請者が考案した顎関節に機械的負荷を与えた実験モデルを使用した。

ラットには麻酔下にて、顎外固定装置と両側下顎体部にレジン製のキャップを装着し、両者をコイルスプリングにて左右ともに約50gの張力となるよう固定した(図1)。粉末と固形の混合飼料を与え、飲水摂食は自由な環境下で飼育する。ラット顎関節に負荷を与えるモデルを用いた過去の報告では、装着後7日目には適応が生じて回復傾向が見られたことから、装置装着5日後に灌流固定(実験群)と、装置を装着せずに飼育したもの(対照群)を使用した。



本研究目的を達成するため、免疫電子顕微鏡法を用いて中間径フィラメントの異なる発現様式を呈する細胞間で、微細構造学的特徴を比較検討した。そのうち特に、機械的負荷により数が増加することが確認されたデスミン陽性細胞においては、関節円板における負荷による血管形成への関与を含めて免

疫細胞化学的に検索する。機械的負荷による顎関節円板細胞の動態、変化を明らかにし、その細胞生物学的な機能と意義を考察した。

4. 研究成果

機械的負荷を与えた実験群の連続凍結切片において、デスミン免疫染色を行い、四酸化オスミウムにて後固定後、樹脂包埋し、超薄切片を作成した。電子染色後、デジタル透過型電子顕微鏡(日立7650)を用いて、デスミン陽性反応を示す細胞の微細構造学的特徴について検討した。これらの細胞は大きな核を持つ大型の細胞で、細胞内小器官は疎であり、比較的分化度低い細胞と考えられた(図2, C)。また、特徴的な所見として、デスミン陽性の突起状の細胞質を有しており(図2, A)、運動や遊走機能を持つと考えられた。また、円板内で、デスミン陽性細胞が存在する部位の近傍には、微少な毛細血管の存在が認められた。

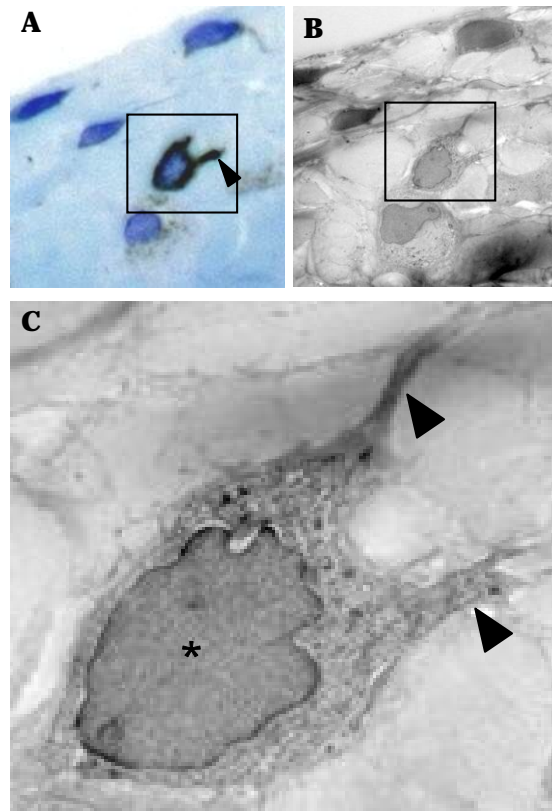


図2. Aは顎関節関節円板後方部の準超薄切片におけるデスミン免疫染色像とBは同部位の超薄切片における電子顕微鏡像。CはA, Bにおける枠の拡大図を示す。デスミン陽性細胞は比較的大きな核を有し(*), 細胞内小器官は疎である。また、デスミン陽性の細胞突起(黒矢尻)を有している。

顎関節部への持続的負荷により、関節円板に血管形成を含めた治癒機転が生じ、増加したデスミン陽性細胞は、周皮細胞前駆細胞であるという仮説に基づき、血管形成に着目した免疫組織学的な検討を行った。

負荷装置を装着した実験群における関節円板内の後方部では、デスミン陽性細胞数は、申請者が行った過去の報告同様に増加していた(図3, B)。また、対比染色の染色性で確認されるコラーゲン繊維の密度に関して、実験群では対照群に比べ疎な状態となっており(図3, B)、関節円板への機械的負荷の影響が考えられた。続いて、得られた連続凍結切片を用いて、血管形成に関与すると考えられるタンパクの発現を両群で比較、検討したところ、実験群では対照群に比べ VEGF(血管内皮細胞増殖因子)陽性細胞が多数認められた(図3, D)。さらに、実験群において、特に下顎頭後方部と接触することで、機械的負荷が強く作用したと考えられる関節腔に接した円板の表層では、血管内皮細胞を標識する RECA-1 陽性細胞が多数存在し(図3, F)、これは対照群の円板での発現は明らかではなかった。

以上の結果より、微細構造学的な検討から、機械的負荷を与えた関節円板内に有意に増加したデスミン陽性細胞は、大きな核を備え、細胞内小器官は疎という、比較的分化度低い細胞の特徴を示していた。また、特筆すべき所見としては、デスミン陽性反応を示す突起状の細胞質を有しており、これは、デスミン陽性細胞は移動や、遊走能を備えていることが示唆された。また、免疫組織学的な検討から、実験群では血管新生に関わると考えられる VEGF(血管内皮細胞増殖因子)陽性の細胞や、血管内皮細胞を示す RECA-1 陽性細胞が増加していた。

申請者が行った過去の報告も合わせて今回の結果を考察すると、従来、顎関節関節円板は、血管供給がない密な繊維性結合組織と考えられていたが、機械的負荷を与えた関節円板の後方部では、血管新生を含めた治癒機転が中心に生じている可能性が考えられ、また、増加したデスミン陽性細胞は、血管新生における血管周皮細胞の前駆細胞の特徴と矛盾しない結果が、微細構造学的、免疫組織学的な検討を行うことで確認することができた。

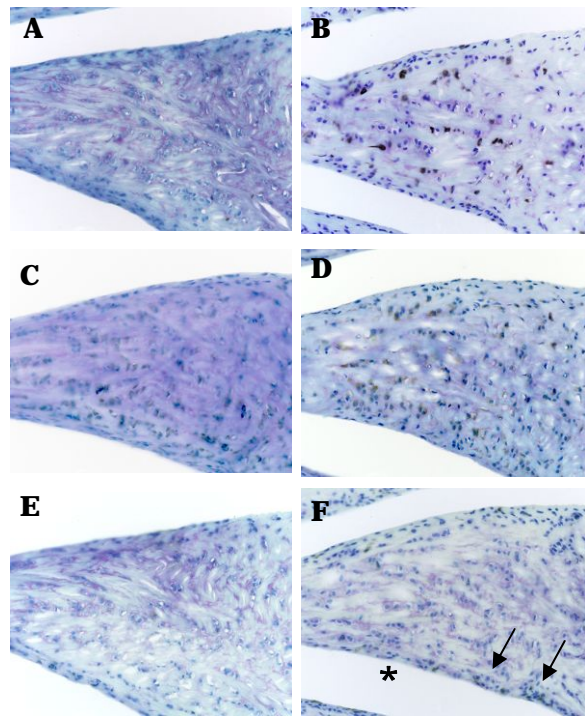


図3．ラット顎関節関節円板後方部における、連続凍結切片における免疫染色像．A, C, E は対照群, B, D, F は実験群を示し, A, B はデスミン免疫染色像, C, D は VEGF 免疫染色像, E, F は RECA-1 免疫染色像を示す．準超薄切片におけるデスミン免疫染色像と B は同部位の超薄切片における電子顕微鏡像．C は A, B における枠の拡大図を示す．過去の報告同様に、デスミン陽性細胞は対照群(A)に比べ、実験群で陽性細胞数が多く認められる(B)。また、VEGF 陽性細胞も実験群では、対照群に比べ多く(D)、円板内全体に多数存在する。RECA-1 陽性細胞は、対照群にはほとんど認められないが、実験群の関節腔(*)に接した関節円板の表層において認められた(矢印)。

5．主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 真柄 仁 (Magara Jin)
新潟大学・医歯学総合病院 助教
研究者番号：90452060