

ふりがな にわの まさひろ
氏 名 庭野 将広
学 位 博 士 (歯学)
学 位 記 番 号 新大院博 (歯) 第 1 1 8 号
学位授与の日付 平成 2 0 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博 士 論 文 名

Immunocytochemical Localization of Caveolin-3 in the Synoviocytes of the Rat Temporomandibular Joint During Development.

(ラット顎関節滑膜の発生過程におけるカベオリン-3 タンパクの免疫細胞化学的局在)

論文審査委員 主査 高木 律男 教 授
 副査 前田 健康 教 授
 齊藤 力 教 授

博士論文の要旨

【緒言】

カベオラは細胞膜の陥凹として認められる直径 50nm~100nm の膜マイクロドメインであり、細胞においてシグナル伝達や物質輸送などさまざまな重要な役割を担う場とされている。その構築にはカベオリントタンパクが必須であり、多くの細胞に発現するカベオリン-1、-2 (Cav1、2) と筋特異的なカベオリン-3 (Cav3) に分類される。

顎関節滑膜は関節包内面のうち、関節軟骨および関節円板を除く部分を覆っており、関節腔に面している滑膜表層細胞層と下層の滑膜下組織から成る。滑膜表層細胞層には A 型細胞と B 型細胞の 2 種類の細胞が存在しており、A 型細胞はマクロファージ様、B 型細胞は線維芽細胞様の機能を有するとされている。このうち、B 型細胞はヒアルロン酸などの滑液に必須の成分を産生、分泌する重要な役割を担っているが、その細胞生物学的な特徴に関して未だ不明な点が多く存在する。これまでの研究から、成熟ラット顎関節において、B 型細胞に特異的に Cav3 を発現するカベオラが存在し、さらに一部の細胞内小器官の十分発達した B 型細胞のみが Cav3 を発現することが明らかになっている。すなわち、Cav3 の発現は B 型細胞の分化、成熟を反映していると考えられるが、その詳細は明らかでない。そこで本研究では、発育過程のラット顎関節滑膜を対象とし、滑膜表層細胞の分化におけるカベオリンの局在と微細構造の変化について免疫細胞化学的に検討した。

【材料と方法】

材料として生後 1、3、5、7、14、21 日目のウィスター系ラットを用い、灌流固定後、EDTA にて脱灰を行った。顎関節の矢状断連続凍結切片を作製し、抗 Cav1、3 抗体を用いて免疫染色を行った。一部の免疫染色切片は樹脂包埋後、準超薄切片と超薄切片を作成し、光線顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。さらに、Cav3 と Cav1 および B 型細胞のマーカーである heat shock protein 25 (Hsp25) を二重標識し、蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果】

生後 1 日目には関節腔が形成されており、生後 3 日目には関節腔の拡大と上関節腔後方滑膜における滑膜ヒダの形成が始まった。生後 5 日目から 7 日目にかけて滑膜ヒダは大きさを増し、滑膜表層細胞層と滑膜下層の境界が明瞭化していた。この時期には Hsp25 免疫陽性の楕円形あるいは扁平な形態をした B 型細胞が滑膜表層に配列し、微細構造学的に明るい核や少数の粗面小胞体、細胞質突起、Cav1 免疫陽性のわずかなカベオラを特徴とする B 型細胞と、クロマチンに富む核、ライソゾーム、空胞、偽足様突起を特徴とする A 型細胞が区別された。この時期までは骨格筋以外に Cav3 免疫陽性反応は認められなかった。生後 14 日目になると、1 から 3 層の滑膜表層細胞層が形成され、成熟ラットと同様の光顕像が確認された。この時期に初めて滑膜表層細胞層における Cav3 の発現が認められ、微細構造学的には、良く発達した細胞質突起や粗面小胞体と、より多くのカベオラをもっており、成熟した B 型細胞に類似していた。21 日目になるといくつかの発達した滑膜ヒダがみられ、Cav3 免疫陽性細胞数の増加と、免疫陽性反応の増強が認められた。Hsp25 免疫陽性 B 型細胞は太く長い細胞質突起をもち、滑膜表層をシート状に覆っており、その細胞膜のカベオラに Cav3 の発現がみられた。一方で、粗面小胞体などの細胞内小器官に乏しい B 型細胞は Cav3 の発現を欠いており、また、A 型細胞においても Cav3 の発現は全く認められなかった。

【考察】

本研究結果から、滑膜表層細胞層を構成している B 型細胞のうち、成熟した形態学的特徴をもつものが Cav3 を発現することが明らかになり、Cav3 の発現は B 型細胞の分化段階に強く関与していることが示唆された。B 型細胞における Cav3 の機能的な役割

については議論の余地があるが、筋組織においてはカベオラ形成のみならず筋細胞の分化に関与し、また細胞増殖を抑制する働きを持っているとする報告などが散見される。Cav1 が未熟な B 型細胞のカベオラに存在したこと、また滑膜表層細胞が増殖を終了し、成熟ラットと同様の多層配列を示す生後 14 日目より Cav3 が発現していたことから、B 型細胞においても同様の機能を果たしている可能性があると考えられる。さらに、Cav3 の発現が開始する生後 14 日目頃は第一臼歯の咬合が確立する時期であり、顎関節においては顎運動の複雑化や滑膜表層細胞層における B 型細胞の急激な増加がみられる。その後の Cav3 発現が増強する時期には咀嚼器官の発達による咬合力の影響により、歯根膜の感覚受容器も急速に発達することが分かっている。すなわち、咀嚼器官の活発化、複雑化に伴う顎関節への負荷が Cav3 の発現と深く関わっていることが示唆された。

審査結果の要旨

顎関節は頭部に存在する唯一の滑膜関節であると同時に、他の関節にはない多くの特色を有している。その構造は顎運動という特殊な運動を可能にしているため、運動様式や成長発育の段階において構造的な変化や相違点が認められる。これらの変化は顎運動がスムーズに行われるために必要なものであり、形態的特長から機能および役割を推測することが可能である。

顎関節において解剖学的特徴であるとされる関節円板（関節腔を完全に上下に分けている）および線維軟骨（下顎頭および下顎窩・関節結節の表面を覆う。滑膜関節に一般的な硝子軟骨ではない）には、血管の分布はなく、関節円板の周囲には滑膜が存在し、これら血管のない組織に分布する細胞への血管外栄養路を形成し、それらの代謝（滑液の分泌、老廃物の処理）を担っている。

顎運動が開始することは、関節円板、関節軟骨が機能し始めることを意味しており、それに伴う滑膜の発育は顎運動と密接に関連している可能性が高い。

今回着目したカベオリン-3 タンパクは、これまで報告された B 型細胞のマーカーとは異なり、滑膜の最表層に位置する線維芽細胞様 B 型細胞のみを標識するマーカーであるという免疫細胞化学的な意義を持っている。すなわち、この発現部位は生後 14 日目から一部の細胞内小器官が十分に発達した B 型細胞のみに認められるようになり、ちょうど大白歯の萌出時期すなわち臼歯部での咀嚼運動を目的とする顎運動が開始される時期に一致していた。顎運動が盛んになることで関節構成組織の代謝も盛んになると考えられ、この時期に滑液を分泌する能力を有する B 型細胞が成熟した形態になると思われる。これまでの研究で、B 型細胞はストレス蛋白質である Hsp25 およびカベオリン-3 のいずれにも陽性を示すことが明らかになったが、Hsp25 が B 型細胞の成熟度に関係なく発現し、過去の他の報告にもあるようにアクチンの動態と強く関連していると推測されるのに対して、カベオリン-3 は形態的に成熟した B 型細胞のみに発現しており、両者の発現時期は異なることが明らかになった。すなわち、カベオリン-3 免疫活性の発現は単に発育の時期によるものではなく、B 型細胞の分化段階を反映していると考えられる点が興味深い。

カベオリンのサブタイプとしてカベオリン-3 はこれまで、筋細胞膜のカベオラに特異的に発現するとされてきたが、B 型細胞においては未熟な時期にカベオリン-1 が発現し、細胞内小器官の成熟に伴い、また咀嚼運動の開始という時期に一致して、カベオリン-3

の発現がみられるという形で同一の細胞で成熟度に関連して発現様式を変えていることも、今後カベオリンの機能を考察する上で重要な所見と思われる。

顎関節は四肢の関節に比べて、非常に自由度が高い関節であり、そこに存在する滑膜は硬組織に囲まれた部位である上に、対象とする動物種により咀嚼様式に合った形態的な差が認められ、研究対象とすること自体が難しいため、これまで十分な検討がなされていない。しかし、これまでに教室で行ってきたB型細胞に着目した形での一連の研究は、関節のストレスや代謝を考察する上で、非常に重要な所見が得られる可能性を秘めている。今回の研究はその一端を明らかにした研究として、学術的意義は高く、学位論文としての価値を認める。