

## 学位研究紹介

## マウス顎関節滑膜B細胞におけるHsp25の発現について

### Expression of 25kDa heat shock protein by synovial type B cells of the mouse temporomandibular joint

新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座  
摂食機能再建学分野  
安藤栄吾

Division of Removable Prosthodontic, Department of Tissue  
Regeneration and Regeneration, Niigata University Graduate  
School of Medical and Dental Sciences  
Eigo Andoh

#### 【目 的】

Hsp25は低分子量熱ショックタンパクの一つで、熱ショック、酸化ストレスや有害な化学物質などにより惹起される細胞傷害から細胞を防御する役割を担っている。さらにストレス状態のみならず、正常状態においても発現し、細胞増殖、維持、発生過程に関与していることが知られている。

顎関節症の患者の関節内視鏡所見および病理学的所見から、顎関節滑膜に炎症反応の存在が指摘されており、顎関節症の病態の理解には正常滑膜組織の構造を理解することが重要である。顎関節滑膜表層を覆う表層細胞は、電子顕微鏡的観察からマクロファージ様細胞の滑膜A細胞と線維芽細胞様細胞の滑膜B細胞から構成されることが知られているが、光線顕微鏡レベルでこの2種類の細胞を区別することは困難だった。その理由の一つとしてこれら細胞を特異的に染色することが不可能だったことがあげられる。

近年、ラット顎関節滑膜B細胞がHsp25を発現し、さらに特徴的な細胞質突起を有していることが報告され、Hsp25が顎関節滑膜B細胞のマーカー物質であることが示唆された。しかしながら、このHsp25が他の動物の顎関節滑膜B細胞のマーカー物質となりうるのか、他の動物でも滑膜B細胞は特徴的な細胞質突起を有するのか、さらに滑液から吸収するのではなく滑膜B細胞自身がHsp25を産生しているかは不明である。

そこで本研究では、以上のことを明らかにすることを目的として、マウス顎関節滑膜組織を対象に、光顕ならびに電顕的免疫細胞化学的手法、またマウスcRNAプ

ローベを独自に作製し、*in situ* hybridization法を用いて検討した。

#### 【方 法】

実験動物として4週齢の正常雄性ICRマウス8匹を用いた。8%抱水クロラル麻酔下で4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定した。10%EDTA溶液で脱灰した後、免疫細胞化学用に厚さ30 $\mu$ mの矢状断クリオスタット切片を作製した。免疫染色は抗Hsp25ポリクローナル抗体を用いたABC法にて行った。反応部位の可視化はDAB発色またはストレプトアビジン-FITCにて行い、光線顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。また、免疫染色した一部の切片はオスミウム後固定後、樹脂包埋し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。さらに3匹のマウスをRNase freeの条件下で灌流固定し、厚さ5mmの矢状断パラフィン切片を作製し、DIG標識したcRNAプローブを用いて*in situ* hybridizationを行った。Hsp25mRNAのシグナルは抗DIGモノクローナル抗体を用いた免疫染色にて行い、FITCにて可視化し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

#### 【結果と考察】

滑膜表層細胞層の構造は部位によって著しく異なり、滑膜細胞が重層上皮様に配列する部位と単層に配列する部位が混在していた。滑膜表層を構成する特定の細胞に強いHsp25免疫陽性反応が見られた(図1)。

共焦点レーザー顕微鏡による観察から、Hsp25免疫陽性細胞は細胞突起をもつ特徴的な形態を呈していた。重層上皮様に配列する部位では、Hsp25免疫陽性細胞は、関節腔に向かって細胞突起を伸ばしており、樹状突起様に枝分かれして滑膜表層で細い細胞突起の叢を形成していた(図2)。一方、単層上皮様を示す部位ではHsp25陽性細胞から伸びる細長い細胞突起が関節腔内面を被覆するように走行していた。

電子顕微鏡による観察から、Hsp25免疫陽性を示す滑膜細胞にはよく発達した粗面小胞体と分泌顆粒が見られ、線維芽細胞様の滑膜B細胞であることが示唆された。これとは対照的に、Hsp25免疫陽性反応はマクロファージ様の滑膜A細胞にはほとんどみられなかった(図3)。

以上の結果から、Hsp25が少なくともげっ歯類の滑膜B細胞のマーカー物質として有効であることが示唆された。また、滑膜B細胞は従来考えられたような円形の細胞ではなく、長い細胞質突起を有し、しばしば関節腔を

裏打ちすることが確認された。

*in situ* hybridization の結果から、強いHsp25mRNAのシグナルが滑膜表層細胞の細胞質に観察された(図4)。滑膜B細胞が滑液を産生し、吸収する能力を有することが知られているが、この結果は滑膜B細胞に発現するHsp25は、滑液由来ではなく滑膜B細胞自身が産生していることを示している。

## 【文 献】

Andoh E., Kawano Y., Ajima H., Nozawa-Inoue K., Kohno S., and Maeda T.: Expression of 25kDa heat shock protein by synovial type B cells of the mouse temporomandibular joint. Arch. Oral Biol., 46 (10): 947-954, 2001.

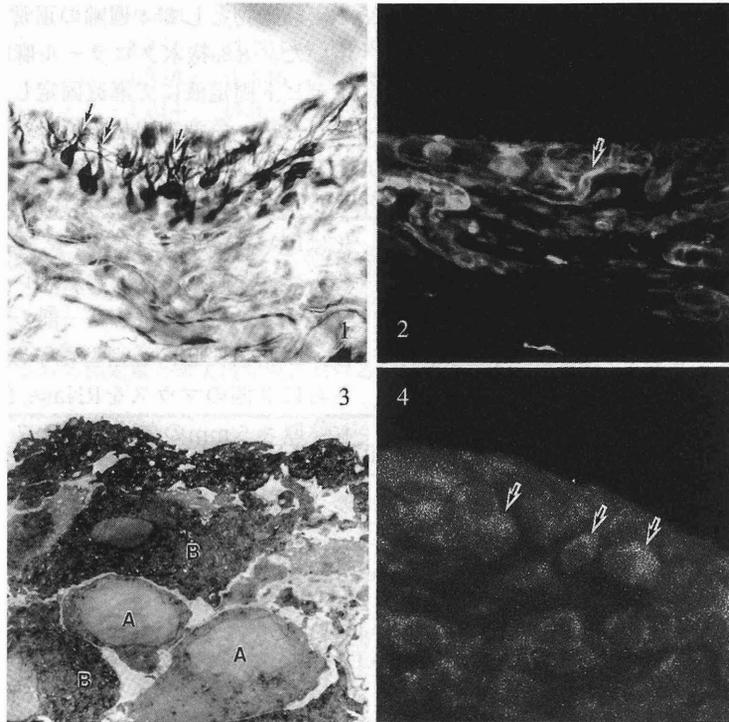


図1. マウス顎関節滑膜のHsp25免疫染色像(DAB発色)。細胞質突起を持つ細胞が観察される(矢印)。

図2. マウス顎関節滑膜のHsp25免疫染色像(蛍光抗体法)。共焦点レーザー顕微鏡による観察ではHsp25免疫陽性細胞の形態がより明瞭に観察される(矢印)。

図3. マウス顎関節滑膜の免疫電顕像。滑膜表層細胞層は免疫陽性細胞と免疫陰性細胞から構成されている。Hsp25免疫陽性細胞の細胞質は電子密度の濃いHsp25免疫陽性産物で満たされていた。これらの細胞にはよく発達した粗面小胞体と分泌顆粒が見られたことから、線維芽細胞様のB型滑膜細胞(B)に分類されることが確認される。マクロファージ様のA型滑膜細胞(A)には免疫陽性反応は見られない。

図4. マウス顎関節滑膜における、Hsp25mRNAの発現(*in situ* hybridization法)。強いHsp25mRNAのシグナル(矢印)が、滑膜表層細胞の核をのぞく細胞質に観察される。(図1~4は、Andoh et al (A. O. B 46: 949-954, 2001)より許可を得て転載)