ヒト顎関節標本における TGF- β の局在について (免疫組織化学的研究)

吉田 博昭・藤田 茂之・飯塚 忠彦

Localization of TGF- β in human TMJ specimens by immunohistochemical methods

Hiroaki YOSHIDA・Shigeyuki FUJITA・Tadahiko IIZUKA

Abstract: In this study, we immunohistochemically investigated the expression of TGF- β in 16 human temporomandibular joint (TMJ) discs.

The specimens were obtained at discectomy and autopsy.

TGF- β showed three types of expression: (1) at the blood cells in capillaries; (2) around fibrocytes and at the lacunae of chondrocytes in the disc; and (3) at the stroma of the hyperplastic synovial membrane and proliferating synovial membrane.

The first two types were observed in all cases, including control.

The last type was seen only in internal derangement of the TMJ.

The results suggest that TGF- β is involved in the pathogenesis of synovitis.

Key words: TGF- β (TGF- β), temporomandibular joint (TMJ) (顎関節), immunohistochemistry (免疫組織化学), internal derangement of TMJ (顎関節内障), synovitis (滑膜炎)

緒

言

調査対象および方法

従来、顎関節症は、顎関節部を中心とする疼痛、開口障害、顎運動時の関節雑音などを主症状とし、かつ臨床的に明らかな炎症症状を欠く疾患であると認識されてきた¹⁾。しかし、最近では、剖検、手術所見、顎関節鏡視法の進歩により、顎関節滑膜などに炎症性変化が生じていることが報告されている^{2~6)}。

今回、われわれは、細胞増殖因子、軟骨誘導因子など生体内におけるサイトカインとしてさまざまな作用を有する TGF- β について、ヒト顎関節円板手術標本における局在を免疫組織化学的に分析し、顎関節症の臨床症状ならびに顎関節の形態学的変化との関連について調査した。

1. 調査対象

1) 対象症例

最近1年間に京都大学医学部口腔外科を受診し、各種顎関節疾患により関節円板摘出術を施行された20歳から72歳までの男性4例5関節、女性8例9関節、さらに1例の新鮮女性屍体(死後12時間)の剖検により得られた両側関節の計13例16関節の顎関節円板ならびに周囲組織である。

2) 顎関節円板摘出症例の臨床症状

症例1, 2は、舌悪性腫瘍全身転移のため当科にて死去され、病理解剖剖検より得られた対照症例で、生前には臨床症状はみられず、開口度も40mmであったが、剖検の際に右側にわずかな前方転位が認められた。症例3は開口度3mmという強度の右側顎関節強直症のため出生直後より約35年間、ほとんど機能していない対側(左側)の顎関節円板である。それ以外は、開口度が18~50mmのすべて疼痛を伴う顎関節症の円板であり、前方転位を伴うものが10例、円板穿孔が4例、OA(骨変形性顎関節炎)変化が6例、RA(リウマチ性関節炎)既往のみられたものは皆無であった。

京都大学医学部口腔外科学教室

(主任: 飯塚忠彦教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Faculty of Medicine, Kyoto University (Chief: Prof.
Tadahiko Iizuka)

受付日: 平成7年9月20日

表1 顎関節円板摘出症例の臨床症状

症例	臨床診断名	左右	年齢	性	発症から手術 までの期間	関節 疼痛	関節 雑音	開口度 (mm)	関節円板 前方転移	円板 穿孔	0 A 変化	RA 既往	前処置
1	対照	左	61	女				40					
2	対照	右	61	女				40	±				
3	顎関節強直症	左	36	男	36 年 0 か月			3					
4	Ⅱ＋Ⅲ型	右	20	女	2 年 2 か月	＋	＋	32	＋				D, S, M, A
5	Ⅳ型	右	25	女	10 年 0 か月	＝		50			＋		D, S
6	Ⅳ型	左	32	女	1 年 8 か月	＋	＋	33	＋	＋	＋		D, S, M, A
7	Ⅳ型	右	32	男	4 年 3 か月	＝	＋	40	＋				D, S, B
8	Ⅳ型	左	32	男	4 年 8 か月	＋		40					D, S, B
9	Ⅲ＋Ⅳ型	左	36	女	5 年 3 か月	＋	＋	32	＋				D, S, A
10	Ⅳ型	左	37	女	3 年 2 か月	＝	＋	42	±				D, S, M
11	Ⅳ型	右	37	女	3 年 2 か月	＋		42					D, S, M
12	Ⅳ型	左	52	女	1 年 6 か月	＋	＋	39	＋	＋	＋		D, S, M
13	Ⅳ型	右	57	女	1 年 4 か月	＋		25	＋	＋	＋		D, S,
14	Ⅰ＋Ⅳ型	左	64	男	4 年 10 か月	＋		45	＋		＋		D, S, P
15	Ⅳ型	左	72	女	2 年 9 か月	＋		37	＋	＋			D, S
16	Ⅳ型	右	72	男	1 年 6 か月	＝		18	＋		＋		D, S, A

関節疼痛

前処置

＝：鎮痛剤を服用しても疼痛の残るもの
＋：鎮痛剤の服用により疼痛の消失するもの
＋：鎮痛剤の必要ない自制的な疼痛
空白：疼痛のないもの

D：筋弛緩剤、鎮痛剤などの薬物療法
S：スプリント療法
M：マニプレーション療法
P：バンピング療法
A：顎関節鏡視下手術
B：各種神経ブロック

(表1).

て正常うさぎ血清を用いた陰性対照試験を行い、すべてが陰性であることを確認した。

2. 方法

1) 固定・包埋・切片作製

手術により得られた組織は4%パラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋し、5 μm 厚で矢状方向の組織切片を作製した。

2) 病理組織学的検索

ヘマトキシリン－エオジン染色ならびにトルイジンブルー染色を行った。

3) 免疫組織学的検索

染色法はすべて通法どおりの間接酵素抗体法により行った。1次抗体は、TGF-β 1, 2 (うさぎポリクロナール抗体, R & D 社製造) を50倍希釈し4℃で12時間、1次抗体を反応させた。次いで、2次抗体は、WAKO 社製の HRP 標識抗うさぎ IgG 抗体を50倍希釈したうえで室温で1時間反応させた。さらに、3, 3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) にて呈色反応を行い、ヘマトキシリンによる核染色の後、透徹、封入した。なお、同時に一次抗体の代用とし

結果

免疫組織化学での TGF-β ポリクロナール抗体の、発現様式は、3通りの様式を示した。

1) 後部結合組織や滑膜細胞層の毛細管内血球細胞にみられるもの (写真1)。

2) 円板内の線維細胞周囲や軟骨細胞の小腔 (lacunae) にみられるもの (写真2)。

3) 肥厚や増生した滑膜細胞層の間質部にみられるもの (写真3)。

このうち、1) と2) の発現は、対照症例を含めて、ほぼすべての症例に観察された。

しかし、3) の発現様式は、症例1, 2, 3の対象症例には観察されず、症例4から16の、顎関節症症例にのみ観察され、さらに、滑膜の肥厚や増生の著明な症例であるほど、TGF-β も強い陽性反応がみられる傾

写真1 毛細管内の血球細胞に陽性反応(矢印)が認められる。(核染色ヘマトキシリン ×400)

写真4 関節円板の矢状断切片, 滑膜の増殖が著しい部位に陽性反応の偏在(矢印)が認められる。(A)は前方を, (U)は上方を示す。(核染色ヘマトキシリン ×1)

写真2 軟骨細胞の小腔に陽性反応(矢印)が認められる。(核染色ヘマトキシリン ×400)

写真5 肥厚した滑膜層(S)の間質に陽性反応(矢印)が認められる。(核染色ヘマトキシリン ×50)

写真3 滑膜層(S)と関節円板(D)との間に陽性反応の明らかな差(矢印)が認められる。(核染色ヘマトキシリン ×50)

向があった(写真4, 5)。

考 察

TGF- β は細胞増殖因子とされるサイカインの1つであり、血小板や骨、胎盤など、正常の細胞や組織に大量に含まれている。

したがって、本研究で、後部結合組織や滑膜細胞層の毛細管内血球細胞での発現様式がほとんどすべての症例に確認されたことは特に矛盾はない結果と思われる。

TGF- β は、発見当初は細胞増殖因子とされていたが、量依存性の因子があるとされ、細胞の種類や細胞の分化の程度によって増殖促進にも抑制にも作用するとされている⁷⁾。近年、その作用は上皮由来の細胞だけでなく、血管内皮細胞や血球細胞の増殖も抑制することが明らかにされた。そして線維芽細胞や血管平滑

筋細胞などの、比較的限られた条件のみで増殖が促進されることがしだいに明らかになった^{8, 9)}。

現在, TGF- β には1から5までの5つのアイソフォームが確認されている。それぞれは異なった時期に異なった部位で作られていて、その産生の調節機構はそれぞれでかなり異なっている¹⁰⁾。

今回の研究で用いた TGF- β は, TGF- β 2 のポリクロナール抗体であるが, TGF- β 1 と交差反応が見られる。

これら, TGF- β 1 と TGF- β 2 は, 1985 年に Seyedin らが, ウシの骨の中から筋芽細胞に作用してコラーゲンやプロテオグリカンの産生を促進し, 生体内で軟骨の形成を促進する物質, CIF-A と CIF-B として報告した¹¹⁾。後に, これは TGF- β 1 と TGF- β 2 と名づけられた。

これら軟骨誘導因子という作用^{12~14)}に着眼すると, 今回の結果での, すべての症例で, 円板内の線維細胞周囲や軟骨細胞の小腔 (lacunae) において, TGF- β の局在が, みとめられたことから, 症例を問わず, 顎関節円板内において軟骨形成が行われているという推測ができる。さらに, 顎関節円板周囲の肥厚, 増生を伴う滑膜の間質部に特異的に TGF- β の局在が観察されたが, これらは顎関節円板の前方転位に適用しようとする変化として周囲の滑膜の軟骨形成が誘導されているという可能性を示唆する興味ある所見である。

さらに Chu ら¹⁵⁾の報告では, リウマチ性関節炎において, TGF- β は, 免疫活性と組織修復を促進する役割を務めているとしている。

TGF- β は, 細胞外基質の産生を亢進する作用など多様な生体内の作用, 機能が認められるといわれている^{16~19)}。本研究において顎関節症症例の炎症性変化が生じていると思われる滑膜において特異的に TGF- β の局在が偏在していたことは, 顎関節症における滑膜反応において TGF- β が, 強く関与していることが示唆された。

結 語

1. ヒト顎関節摘出標本 16 例についての, TGF- β の局在について免疫組織化学的に分析を行った。

2. 発現様式は, 以下の3とうりであった。

第1は, 後部結合組織や滑膜細胞層の毛細管内血球細胞にみられるもの。

第2は, 円板内の線維細胞周囲や軟骨細胞の小腔 (lacunae) にみられるもの。

第3は, 肥厚, 増生した滑膜細胞層の間質部にみられるもの。

3. 第1と第2の発現様式は, 対照症例を含めて, はば全例に観察された。

4. 第3の発現様式は顎関節症症例のみに特異的に

観察され, このことより, 顎関節症における滑膜反応において, TGF- β が, 強く関与していることが示唆された。

引 用 文 献

- 1) 上野 正: 顎関節疾患の診断と治療. 日本歯科評論 170: 1-7 1956.
- 2) 村上賢一郎, 松木優典, 他: 顎関節内障の関節造影, 関節鏡視所見と手術所見との比較検討. 関節鏡 11: 1-6 1986.
- 3) 瀬上夏樹, 村上賢一郎, 他: 顎関節内障クローズドロック症例の関節鏡視所見. 口科誌 38: 857-869 1989.
- 4) 高久 暹: 変形性顎関節症の病理, とくに関節円板の穿孔創について. 日口診誌 4: 24-32 1991.
- 5) 滝川俊也, 藤田茂之, 他: ヒト顎関節関節円板の細胞外基質の免疫組織化学的研究 第1報: ヒト正常顎関節円板について. 日口外誌 38: 863-871 1992.
- 6) 吉田博昭, 藤田茂之, 他: ヒト顎関節手術症例の円板における CD44 の局在についての免疫組織化学的検討 (速報). 日口診誌 8: 313-318 1995.
- 7) Sporn, M.B. and Todaro, G.j.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N Engl J Med 303: 878-880 1980.
- 8) Roberts, A.B. and Sporn, M.B.: The transforming growth Factor- β s. Sporn, M.B. and Roberts, A.B. eds.: Peptide growth factors and their receptors I. 1st Ed, Spinger-Verlag, Berlin, 1990, p.419-472.
- 9) Sporn, M.B. and Roberts, A.B.: Transforming growth factor- β : Multiple actions and potential clinical application. J.A.M.A, 262: 938 1989.
- 10) 山下英俊, 宮園浩平: TGF- β スーパーファミリーの研究の流れ. 実験医学 12: 1503-1505 1994.
- 11) Seyedin, S.M., Segarini, P.R.: et al: Cartilage-inducing factor- β is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor- β . J Biol Chem 262: 1946-1949 1987.
- 12) Bolander, M.E.: Regulation of fracture repair by growth factors. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 200: 165-170 1992.
- 13) 新宮司誠司: 骨折治癒過程における TGF- β の発現と役割. 実験医学 10: 1886-1891 1992.
- 14) 梅原隆司: 関節軟骨欠損部への移植骨端板における Transforming Growth Factor β 1 の

局在. 日整会誌 68: 790-797 1994.

- 15) Chu, C.Q., Field, M., et al: Transforming growth factor- β 1 in rheumatoid synovial membrane and cartilage/pannus junction. Clin Exp Immunol 86: 380-386 1991.
 - 16) Bassols, A. and Massagué, J.: Transforming growth factor β regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. J. Biol. Chem. 263: 3039-3045 1988.
 - 17) Ignatz, R.A. and Massagué, J.: Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem 261: 4337-4345 1986.
 - 18) Varga, J., Rosenbloom, J. et al: Transforming growth factor β (TGF β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. Biochem. J. 247: 597-604 1987.
 - 19) Ignatz, R.A. and Massagué, J.: Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action. Cell 51: 189-197 1987.
-