顎関節内障患者滑膜細胞の TNF- α 刺激による 遺伝子発現プロファイリング

阿久津美和¹⁾・小倉直美^{1, 2)}・酒巻裕之^{1, 2)}
戸邊真希子^{1, 2)}・伊藤 耕^{1, 2)}
安孫子宜光^{2, 3)}・近藤 壽郎^{1, 2)}

Gene expression profiling of synovial fibroblasts from human temporomandibular joint on stimulation with tumor necrosis factor- α

AKUTSU Miwa¹⁾・OGURA Naomi^{1, 2)}・SAKAMAKI Hiroyuki^{1, 2)}
TOBE Makiko^{1, 2)}・ITO Ko^{1, 2)}・ABIKO Yoshimitsu^{2, 3)}
KONDOH Toshiro^{1, 2)}

Abstract: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) plays a key role in pathological conditions of the temporomandibular joint (TMJ). However, the molecular mechanisms by which TNF- α contributes to synovial inflammation remain unclear. In this study, the gene expression profile of synovial fibroblasts stimulated by TNF- α was studied by GeneChip analysis. Synovial fibroblasts were prepared from the tissues of three patients with internal derangement of the TMJ, using the outgrowth method. The synovial cells were stimulated by TNF- α for 4 hours, after which total RNA was extracted with TRIzol. Gene expression profiling was performed using the Affymetrix Gene Chip (Human Genome Focus Array, 8500 genes). Hybridization data were analyzed with GeneSpring software.

Two hundred forty-five genes were found to be TNF- α responsive, showing a greater than two-fold difference in average intensity between the stimulated and control samples. The gene ontology classification was the “trans-regulator”, “catalytic activity”, “transcription regulator”, and “chaperone activity” categories. Among the top 25 up-regulated genes, 8 were found to be chemokines. The expression of chemokines in TNF- α responsive genes measured by GeneChip was confirmed by real time-PCR. Chemokine gene expression was found to be increased by TNF- α .

These results suggest that TNF- α may contribute to inflammation in internal derangement of the TMJ by producing chemokines.

Key words: temporomandibular joint (顎関節), synovial cells (滑膜細胞), GeneChip (GeneChip), TNF- α (腫瘍壊死因子- α), chemokine (ケモカイン)

¹⁾ 日本大学松戸歯学部顎顔面外科学講座
(主任：近藤壽郎教授)

²⁾ 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所
(主任：安孫子宜光教授)

³⁾ 日本大学松戸歯学部生化学・分子生物学講座
(主任：安孫子宜光教授)

¹⁾ Department of Maxillofacial Surgery, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. KONDOH Toshiro)

²⁾ Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. ABIKO Yoshimitsu)

³⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. ABIKO Yoshimitsu)

受付日：2007年3月19日

採択日：2007年6月26日

緒 言

顎関節内障（以下 ID）は、関節円板の転位障害で、顎関節の可動障害、関節痛ならびに関節雑音を主症状とする。近年、関節造影法、MRI および関節鏡等の進歩により、顎関節構造または関節腔内の病的状態を把握することが可能となり、ID 患者の顎関節滑膜における、毛細血管の増生や充血等の炎症所見の報告がなされている¹⁾。

組織学的な研究により、ID 患者の滑膜では、炎症性細胞の浸潤が認められると報告されている²⁾。滑膜は側頭骨関節面、下顎頭関節面、ならびに関節円板を除く関節腔内構

表1 ID患者の臨床所見

ID 患者 No.	(細胞 No.)	性別	年齢	MRI 画像診断	開口障害	関節痛	Wilkes の分類
1	(TMJ1)	F	23	l.ADDw/oR	+	+	Ⅱ
2	(TMJ2)	F	18	r.ADDw/oR	++	+	Ⅲ
3	(TMJ3)	F	26	r.ADDw/oR	++	+	Ⅲ

ID: 顎関節内障, F: 女性, r: 右側, l: 左側, ADDw/oR: 非復位性関節円板前方転位, 開口障害+: ROM30 ~ 34mm, 開口障害++: ROM25 ~ 29mm

造を被覆する組織で, 滑液分泌や細胞外基質の産生等, 顎関節の恒常性維持に重要な構造である。

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) は, リウマチ性関節炎患者の滑液中で高い値を示し, 変形性関節症等においても病態形成に関与する因子の一つと考えられている³⁾。顎関節領域においても, TNF- α は ID 患者の滑液中に検出されている^{4~6)}。さらに, アジュバンド誘導顎関節炎モデルラットで TNF- α の上昇が報告されている⁷⁾。これらのことから, TNF- α は顎関節の炎症状態に関与する重要な因子であることが示唆されている。

近年, DNA microarray 法が開発され, DNA データベースにある多数の遺伝子の発現量解析が可能となった。リウマチ性関節炎における病態遺伝子発現パターンの解析や, バイオマーカー検索のために GeneChip 解析が用いられている^{8~10)}。しかし, 顎関節の滑膜に生じる炎症状態に関する GeneChip 解析の報告はわずかであり, 不明な点が多い¹¹⁾。そこで, 本研究では, ID 患者滑液中で増加するとされる TNF- α で, ID 患者の培養ヒト顎関節滑膜細胞を刺激した時の遺伝子発現変動を GeneChip 解析にて網羅的に検索し, ID 患者顎関節滑膜における炎症病態形成に関与する可能性のある因子を抽出, 検討したので報告する。

材料および方法

1. ヒト顎関節滑膜細胞の培養

ID 患者の顎関節上関節腔鏡視下洗浄療法¹²⁾ および関節円板形成術施行時に, 関節円板後部軟組織表層から滑膜組織を採取した。ID 患者の臨床所見を表1に示す。35mm ディッシュ内に, 滑膜組織から outgrowth 法で滑膜細胞を得た。培養は 10 % Fetal calf serum (FCS) (Cell Culture Technologies 社製) および penicillin G 100 μ g/ml (明治製薬社製), kanamycin 100 μ g/ml (明治製薬社製), fungizone 250ng/ml (CHROMOGENIX 社製) を含む Ham's F12 培地 (Invitrogen 社製) にて, 37 °C, 5 % CO₂ 条件下で行った。35mm ディッシュ内でコンフルエント時を継代数初代とした。得られた滑膜細胞は, 10 % FCS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地を用いて継代培養を行った。培地

交換は週に 2 回行い, 実験には継代数 6 ~ 8 代の細胞を用いた。本研究にはインフォームドコンセントを行った ID 患者 3 名から得た滑膜細胞 (表1: TMJ1, 2, 3) を用いた。本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (認証番号: EC03-003) の指針にしたがって行った。

2. total RNA の抽出

滑膜細胞を 100mm ディッシュ内に 1×10^6 cells 播種し, コンフルエント確認後 2 % FCS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地で 24 時間培養した。その後, TNF- α 10ng/ml (PEPROTECH 社製) を 4 時間作用させ, TRIzol Reagent (Invitrogen 社製) にて細胞溶解し, AGPC 法にて total RNA を抽出した。また, 同時に何も作用させていない細胞からも total RNA を抽出し, control とした。抽出した RNA は使用するまで -80 °C で保存した。

3. GeneChip 解析

total RNA の純度および品質は, RNA 6000 Nano Gel System を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) にて測定し, さらに GeneChip Test 3 Chip (Affymetrix 社製) にて確認した。

GeneChip 解析は, 以下の如く Affymetrix 社の通法に従って行った。すなわち, total RNA 8 μ l を用いて, One-Cycle cDNA Synthesis 法にて double-stranded cDNA を作製し, GeneChip Sample Clean up Module kit (Affymetrix 社製) にて精製した。精製した cDNA から in vitro transcription にて biotin-labeled cRNA を増幅させ精製し, GeneChip に十分な cRNA を得た。次に, cRNA を断片化し, Hybridization cocktail を作製し, Affymetrix Human Genome Focus Array chip に添加し, 45 °C で 16 時間 Hybridization を行った。Hybridization 終了後, Array を Fluidics station (Affymetrix 社製) に設置し, 洗浄および streptavidin Phycoerythrin (SARP: Molecular Probes) を用いた染色を行った。スキャナー (Affymetrix 社製) にて画像を取り込み, Affymetrix Microarray Suite にて蛍光強度の測定を行った。データ解析には GeneSpring 解析ソフト (Agilent Technologies 社製) を用いた。

表2 real time-PCRに使用した Chemokine の primer

Gene	Primers	bp
CCL20 (MIP-3 α)	F 5'-GCA AGC AAC TTT GAC TGC TG-3' R 5'-CAA GTC CAG TGA GGC ACA AA-3'	342
CXCL8 (IL-8)	F 5'-ATC ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3' R 5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C-3'	289
CXCL3 (GRO- γ)	F 5'-TAA ATG ACA GGG TGG GGA AC-3' R 5'-GCA TTA TGC CCT ACA AGC AA-3'	225
CXCL10 (IP-10)	F 5'-TGC AAG CCA ATT TTG TCC ACG TGT TG-3' R 5'-GCA GCT GAT TTG GTG ACC ATC ATT GG-3'	302
CX3CL1 (fractalkine)	F 5'-GAG TGG GTC CAA TGC ACT TT-3' R 5'-CAC AGA CGT TGG TGA TGA GG-3'	241
CXCL1 (GRO- α)	F 5'-TGC AGG GAA TTC ACC CCA AG-3' R 5'-CAG GGC CTC CTT CAG GAA CA-3'	229
CXCL2 (GRO- β)	F 5'-CCC TGC CTT ACA GGA ACA GAA-3' R 5'-TCC CTG CCG TCA CAT TGA TCT-3'	403
CCL5 (RANTES)	F 5'-TAC ACC AGT GGC AAG TGC TC-3' R 5'-GAA GCC TCC CAA GCT AGG AC-3'	199
CXCL6 (GCP-2)	F 5'-CAA TGA TCT GTG CTC TGC AA-3' R 5'-CCA ACA TGA CAC ACA GGA AAA-3'	218
CCL2 (MCP-1)	F 5'-CCA ATT CTC AAA CTG AAG CTC GCA C-3' R 5'-GTT AGC TGC CAG ATT CTT GGG TTG TG-3'	372
GAPDH	F 5'-ATC ACC ATC TTC CAG GAG-3' R 5'-ATC GAC TGT GGT CAT GAG-3'	315

CCL: CC motif chemokine ligand, CXCL: CXC motif chemokine ligand, CX3CL: CX3C motif chemokine ligand, MIP: macrophage inflammatory protein, IL: interleukin, GRO: growth-regulated oncogene, IP: interferon-inducible protein, RANTES: regulated upon activation, normal T expressed and secreted, GCP: granulocyte chemotactic protein, MCP: monocyte chemoattractant protein, GAPDH: glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase

4. real time-PCR

total RNA を $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整し, GeneAmpTM RNA PCR Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて cDNA を作製した. 作成した cDNA 溶液 $2 \mu\text{l}$, DyNAmo SYBRTM Green qPCR Kit (FINNZYMES 社製) $10 \mu\text{l}$, 滅菌精製水 $6 \mu\text{l}$, 下流および上流 primer ($20 \mu\text{M}$) 各々 $1 \mu\text{l}$ を加え全量 $20 \mu\text{l}$ とし, PCR 溶液を作成した. PCR 溶液を DNA Engine Opticon 1 (MJ Research 社製) にて 95°C で 5 分間加熱後, 94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒を 40 サイクル行い, DNA を増幅し, サイバグリーンによる蛍光量をモニターした. コントロールとして GAPDH を用いた. primer を表 2 に示した.

結 果

1. GeneChip データの品質・精度管理

今回の実験では, 3 名の ID 患者より得られたヒト顎関節滑膜細胞 TMJ1, 2, 3 の平均値を用いて, TNF- α 刺激時および無刺激時の遺伝子発現量を解析した. GeneChip 解析にあたり, RNA の純度および品質を Bioanalyzer にて確認した. また, GeneChip の Test Chip にて代表的な house keeping 遺伝子における 3' および 5' 側のシグナル値を比較し, RNA の分解が顕著でないことを確認した.

各サンプル間での比較を目的に, GeneChip データは Hybridization 効率等の差を補正するためシグナル値の normalize を行った. 次に, 発現量の低い遺伝子を信頼できない遺伝子として取り除いたところ, 信頼可能な遺伝子は

図1 遺伝子発現の Scatter plot

A : 全 8,793 遺伝子

B : TNF- α により遺伝子発現上昇率 2 倍以上の遺伝子

8,793 遺伝子中 4,254 遺伝子であった。

2. TNF- α の影響

TMJ1, 2, 3 の TNF- α 刺激時および無刺激時の遺伝子発現量について比較検討した。TNF- α により、発現変動が 2 倍以上変化した遺伝子は、245 遺伝子であった。図 1A は TMJ1, 2, 3 の平均値で 8,793 遺伝子すべてをプロットし、図 1B は TNF- α により変動した 245 遺伝子をプロットした図である。TNF- α によって発現上昇率が 2 倍以上に上昇した遺伝子は 196 遺伝子、1/2 以下に減少した遺伝子は 49 遺伝子であった。また、TNF- α により遺伝子発現上昇率が高かった順に上位から 25 遺伝子を表 3 に示した。

3. Gene Ontology

TNF- α 刺激によって発現量が上昇した 196 遺伝子、減少した 49 遺伝子各々について Gene Ontology (GO) 分類を行った (図 2)。遺伝子発現量上昇群および減少群ともに “trans regulator”, “catalytic activity”, “transcription regulator” および “chaperone activity” に分類される遺伝子が多く認められた。

4. ケモカインの遺伝子発現変動

上位 25 遺伝子中約 1/3 にあたる 8 遺伝子がケモカインであった。また、TNF- α によって遺伝子発現上昇率が 2 倍以上となった遺伝子群のなかには 10 種のケモカイン遺伝子が認められた。この 10 種のケモカインを Scatter plot 中に表した (図 3)。

次に、この 10 種のケモカインについて、real time-PCR 法にて遺伝子発現を確認した。GeneChip 解析で、発現上昇率が高かった CCL20 および CXCL8 遺伝子では、real time-PCR 法においても TMJ1, 2, 3 のすべてにおいて高い上昇率を示していた。その他のケモカインでも TNF- α 刺激によって 8 倍以上の遺伝子発現上昇を認めた (図 4)。

考 察

TNF- α は、代表的な炎症性サイトカインであり、リウマチ性関節炎患者の研究では、滑膜での炎症亢進に関与する他のサイトカインや、細胞外基質分解酵素の産生を促進すると報告されている¹³⁾。ID 患者の滑液解析にて、TNF- α の上昇が報告されており^{4~6)}、ID 患者における関節腔内の炎症病態形成に関与する因子の一つと考えられる。本研究では、ID 患者滑膜における炎症の発症および進行メカニズムの解明を目的として、ID 患者滑液中で上昇するとされる TNF- α を用いて ID 患者の培養顎関節滑膜細胞を刺激し、ID における炎症病態のシミュレーションを行った。具体的には、TNF- α 刺激後の ID 患者滑膜細胞の遺伝子発現変動を GeneChip Focus Array を用いて網羅的に解析した。

TNF- α 刺激によって、2 倍以上遺伝子発現が上昇したものは 196 遺伝子で、1/2 以下に減少したものは 49 遺伝子であった。これらの機能を Gene Ontology にて調査したところ、“trans regulator”, “catalytic activity”, “transcription regulator” および “chaperone activity” に分類される遺伝子が多く認められた。転写活性に関与する遺伝子群の発現が変動することは、TNF- α 刺激によって滑膜細胞が多数のタンパク質を産生することを示唆している。また、TNF- α 刺激により産生されたタンパク質の立体構造維持を行うため、chaperone 活性に関与する遺伝子の発現も変動している可能性が示唆された。

表3 TNF- α による遺伝子発現上昇率

Rank	Gene	Gene Bank	Fold change	Gene title -Affy
1	CCL20	NM_004591	245.8	chemokine (C-C motif) ligand 20
2	CXCL8	AF043337	81.1	interleukin 8
3	IL-15	M11734	40.5	Interleukin 15
4	ICAM1	NM_000201	33.9	intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
5	CXCL3	NM_002090	32.9	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
6	CXCL10	NM_001565	29.4	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
7	BCL2A1	NM_004049	25.8	BCL2-related protein A1
8	GCH1	NM_000161	23.2	GTP cyclohydrolase 1
9	NUDT9	NM_018725	23.1	Nudix type motif 9
10	CX3CL1	U84487	22.8	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
11	DLEU2	NM_006291	19.1	deleted in lymphocytic leukemia 2
12	CXCL1	NM_001511	16.0	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
13	LIF	NM_002309	15.3	Leukemia inhibitory factor
14	IL-6	NM_000600	14.7	interleukin 6
15	PTGS2	NM_000963	14.4	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
16	CXCL2	M57731	14.0	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
17	TNFAIP3	NM_006290	13.5	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
18	CCL5	NM_002985	12.7	chemokine (C-C motif) ligand 5
19	CD83	NM_004233	12.5	CD83 molecule
20	MCSF	M37435	10.0	colony stimulating factor (macrophage)
21	IL-1RN	U65590	9.3	interleukin 1 receptor antagonist
22	NKX3-1	AF247704	9.2	NK3 transcription factor related, locus 1
23	IL-4	NM_006273	9.2	interleukin 4
24	CXCL6	NM_002993	8.6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6
25	MMP1	NM_002421	8.5	matrix metalloproteinase 1

発現上昇を認めた遺伝子群の上位にはケモカインが多く含まれていた。そこで本研究ではケモカインに注目し、GeneChip解析において、TNF- α 刺激で2倍以上の発現上昇を認めた196遺伝子中に含まれたケモカイン遺伝子10種の遺伝子発現上昇率をreal time-PCRで確認した。GeneChip解析に用いたTMJ1, 2, 3各々について、real time-PCRを行ったところ、GeneChipでの上昇率とreal time-PCRでの遺伝子発現上昇率との間に若干の違いを認めた。これは、GeneChip法で用いるin vitro transcriptionとPCR法での増幅効率の違いによるものと考えられた。また、各検体(TMJ1, 2, 3)間で遺伝子発現上昇率に差がみられたのは、患者の個体差や、滑膜の炎症状態の違い等が原因と考えられる。しかし、GeneChip解析でTNF- α 刺激により2倍以上の遺伝子発現上昇を認めたケモカインは、real time-PCRにおいて、いずれのサンプルでも8倍以上の遺伝子発現上昇を認めた。したがって、TNF- α 刺激はヒト滑膜細胞のケモカイン遺伝子発現を上昇させると考えられた。ヒト滑膜細胞に対するTNF- α 刺激により、IL-8, RANTES, MCP-1のタンパク質産生の上昇が報告されており¹⁴⁾、ケモカインはTNF- α により遺伝子レベルのみならず、タンパク質レベルでも発現上昇するものと考えられた。

また過去の報告において、ID患者から採取した滑液中でケモカインが上昇するとの記載もあり¹⁵⁾、ケモカインはID患者の病態形成に関連する因子の一つであると考えられる。

ケモカインは7-16kDaの分泌タンパク質で、N末端側にある2アミノ酸形成モチーフでCXC, CC, CX3CおよびCの4つのサブファミリーに分類される。その働きは、CXCケモカインは主に好中球、CCケモカインは主に単球の遊走および活性を誘導する。さらに、N末端にELR (Glu-Leu-Arg)モチーフをもつCXCケモカインは血管新生に関与すると報告されている¹⁶⁾。また、ケモカインにより炎症性細胞は成熟化し、成熟化した炎症性細胞は炎症性サイトカイン¹⁷⁾および活性酸素等¹⁸⁾を産生するとの報告がある。ケモカインは、ID患者の滑膜における炎症性細胞の浸潤および毛細血管の増生に関与し、さらに炎症状態の増幅に関連すると思われる。

リウマチ性関節炎において、TNF- α 抑制因子を用いた治療が行われている¹⁹⁾。また、TNF- α の影響で上昇するケモカインのレセプターに対し、抗ケモカインレセプター抗体を用いた新しい治療法が研究されている²⁰⁾。今後、ID患者の治療法として、ケモカインの産生を抑制する治療の

図2 Gene Ontology 分類
TNF- α によって遺伝子発現変動を認めた 245 遺伝子の Gene Ontology.

図3 TNF- α で発現変動を認めたケモカイン
CCL: CC motif chemokine ligand, CXCL: CXC motif chemokine ligand, CX3CL: CX3CL motif chemokine ligand

図4 ケモカインの遺伝子発現上昇率
CCL: CC motif chemokine ligand, CXCL: CXC motif chemokine ligand, CX3CL: CX3CL motif chemokine ligand

開発の可能性も考えられる。

本研究では、ID 患者から得た培養ヒト顎関節滑膜細胞を用い、TNF- α 刺激による遺伝子発現変動を GeneChip 解析にて検索した。その結果、TNF- α は ID 患者顎関節滑膜細胞においてケモカイン等の遺伝子発現を上昇させることにより、関節腔内の炎症病態の形成に関与することが示唆さ

れた。炎症環境に存在する滑膜細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、病因関連因子の発現変動を詳細に検討することで、顎関節疾患診断用マイクロアレイチップや新薬の開発等へ研究展開したいと考えている。

結 語

3 名の ID 患者より得た顎関節滑膜細胞 (TMJ1, 2, 3)

を TNF- α で 4 時間刺激したときの遺伝子発現変動を, GeneChip Human Genome Focus Array (Affymetrix 社製) にて検索した. その結果,

1. TMJ1, 2, 3 の平均値で, TNF- α 刺激により遺伝子発現が 2 倍以上上昇した遺伝子は 196 遺伝子で, 1/2 以下に減少した遺伝子は 49 遺伝子であった.

2. 2 倍以上の遺伝子発現変動を認めた遺伝子で Gene Ontology 分類をしたところ, “trans regulator”, “catalytic activity”, “transcription regulator” および “chaperone activity” に分類される遺伝子が多かった.

3. TNF- α により発現上昇した遺伝子の上位にはケモカインが多く含まれていた.

4. GeneChip 解析で遺伝子発現上昇を認めた 10 個のケモカインの, TNF- α 刺激時の遺伝子発現上昇率を real time-PCR で確認したところ, いずれのケモカインも TNF- α 刺激により遺伝子発現の上昇が認められた.

以上の結果から, TNF- α は ID 患者顎関節滑膜細胞においてケモカイン等の遺伝子発現を上昇させることにより, 関節腔内の炎症病態を形成すると考えられた.

稿を終えるにあたり, GeneChip 解析においてご協力いただいた岡朝世氏に深謝致します.

本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 (C) (2) (課題番号: 17592111) および日本大学学術研究助成金 (課題番号: 個 02-113) により行われた.

引用文献

- 1) Hamada, Y., Kondoh, T., et al.: Visually guided temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock: Clinical outcome and its relationship to intra-articular morphologic changes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95: 552-558 2003.
- 2) Kardel, R., Ulfgrén, A.-K., et al.: Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with painful clicking and osteoarthritis in the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32: 390-396 2003.
- 3) Field, M.: Tumour necrosis factor polymorphism in rheumatic diseases. *Q J Med* 94: 237-246 2001.
- 4) Takahashi, T., Kondoh, T., et al.: Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: 135-141 1998.
- 5) Kaneyama, K., Segami, N., et al.: Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg* 40: 418-423 2002.
- 6) Nishimura, M., Segami, N., et al.: Comparison of cytokine level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases in arthrocentesis of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 284-

287 2004.

- 7) Spears, R., Oakes, R., et al.: A determination of tumor necrosis factor expression in TMJ inflammation with the use of microarray analysis. *J Dent Res* 82: 807-813 2003.
- 8) Adarichev, V.A., Vermes, C., et al.: Gene expression profiling in murine autoimmune arthritis during the initiation and progression of joint inflammation. *Arthritis Res Ther* 7: R196-R207 2005.
- 9) Gierer, P., Ibrahim, S., et al.: Gene expression profile and synovial microcirculation at early stages of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 7: R868-R876 2005.
- 10) Shou, J., Bull, C.M., et al.: Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model. *Arthritis Res Ther* 8: R28-R41 2006.
- 11) 小倉直美, 戸邊真希子, 他: Interleukin-1 β 刺激ヒト顎関節滑膜細胞の GeneChip 遺伝子発現プロファイルリング Interleukin-1 とそのレセプター, ケモカインの発現について. *口科誌* 54: 401-409 2005.
- 12) Kondoh, T., Dolwick, M.F., et al.: Visually guided irrigation for patients with symptomatic internal derangement of the temporomandibular joint: A preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95: 544-551 2003.
- 13) Görtz, B., Hayer, S., et al.: Tumour necrosis factor activates the mitogen-activated protein kinases p38 α and ERK in the synovial membrane in vivo. *Arthritis Res Ther* 7: R1140-R1147 2005.
- 14) Ogura, N., Tobe, M., et al.: Tumour necrosis factor- α increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med* 34: 357-363 2005.
- 15) Matsumoto, K., Honda, K., et al.: Cytokine profile in synovial fluid from patients with internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary study. *Dentomaxillofac Radiol* 35: 432-441 2006.
- 16) 義江 修: ケモカインスーパーファミリーの構造と機能. 義江 修, 野見山尚之, 宮坂昌之監修; ケモカインハンドブック, 1 版, 秀潤社, 東京, 2000, 10-19 頁.
- 17) Tiku, K., Tiku, M.L., et al.: Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 136: 3677-3685 1986.
- 18) Mikawa, K., Akamatsu, H., et al.: The effects of sargrelate on superoxide production by human neutrophils. *Reg Anesth Pain Med* 25: 181-186 2000.
- 19) Fautrel, B., Constantin, A., et al.: Recommendation of the French Society for Rheumatology. TNF- α antagonist therapy in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 73: 433-441 2006.
- 20) Tani, K., Shimizu, T., et al.: Chemokines in synovial inflammation in rheumatoid arthritis: basic and clinical aspects. *Mod Rheumatol* 12: 93-99 2002.