

## 頸関節炎によって惹起される咬筋機械痛覚過敏に対する 三叉神経節内 TNF- $\alpha$ の関与

伊 藤 玲 央

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導: 祇園白信仁 教授, 岩田幸一 教授, 篠田雅路 准教授)

**要旨:** 頸関節症(TMD)患者はしばしば、頸関節(TMJ)や頸顔面領域に痛みを訴えて来院することがよく知られているが、その発症機序の詳細は不明である。そこで、本研究では TMJ 炎症発症時の三叉神経節(TG)における tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )伝達が咬筋機械痛覚過敏へいかに関与するかを明らかにすることを目的とした。ラット左側 TMJ に炎症起因性物質である complete Freund's adjuvant(CFA)を投与し、咬筋に径の太いデジタルフォースゲージまたは径の細いフォンフライフィラメントにより機械刺激を加え、逃避反射閾値を経日的に測定し、咬筋の機械感受性の変化を解析した。また、TG 内 satellite glial cells(SGCs)の活性化と TNF- $\alpha$  の発現を免疫組織化学染色によって調べた。

その結果、TMJ に炎症が引き起こされたラットでのデジタルフォースゲージによる測定では、逃避反射閾値の有意な低下がみられた。一方、フォンフライフィラメントで測定した結果に有意な差はみられなかった。このことから、TMJ での炎症は咬筋そのものに機械痛覚過敏を引き起こしたことが示された。さらに、TMJ 炎症群の TG 内を免疫組織化学的に検索した結果、SGCs の活性化と TNF- $\alpha$  陽性細胞数が有意に増加していることが明らかになった。

以上の結果は、TMJ 炎症による持続的な咬筋機械痛覚過敏が TG 内 TNF- $\alpha$  シグナル伝達を介した SGCs-TG ニューロン間の機能的相互作用によってもたらされることを示唆しており、TNF- $\alpha$  シグナル伝達の阻害が疼痛治療の標的となる可能性が示された。

**キーワード:** TNF- $\alpha$ , satellite cells, 頸関節, 咬筋機械痛覚過敏, 三叉神経

### 緒 言

頸関節症(TMD)患者はしばしば、頸関節(TMJ)や頸顔面領域に痛みを訴えて来院することがよく知られている<sup>1,2)</sup>。さらに、多くの TMD 患者では頸運動により頸顔面領域全体にわたって疼痛が発症すること、また咀嚼や嚥下のような口腔顔面機能の明らかな低下が現れるといわれている<sup>2)</sup>。このようなことから、TMD により口腔顔面領域に引き起こされた運動機能障害は最終的に摂食障害を誘導し、患者の QOL の低下を招くと考えられている。TMD に起因する頸顔面痛の適切な治療法を開発するためには、TMD に関連する咬筋痛の発症メカニズムを解明することが重要である。

TMJ の炎症は TMJ だけでなく咬筋にも慢性痛を引き起こす<sup>2)</sup>。TMJ の炎症が長く続くと、TMJ を支配している三叉神経節(TG)細胞の興奮性は著しく増大することによって感作され、高頻度の活動電位が三叉神経脊髄路核尾側亜核や上部頸髄などの上位中枢へ伝達される<sup>4)</sup>。さらに、TMJ 領域に多くの免疫細胞が現れ、様々なサイトカインや炎症性メディエーターがこれらの免疫細胞から放出される。その結果、一次求心性神経の感作がさら

に進むといわれている<sup>1,5)</sup>。

また、satellite glial cells(SGCs)は頸顔面の炎症または三叉神経損傷によって TG 内で活性化することが知られている<sup>6,7)</sup>。TG 内の SGCs とニューロンが互いに 10 μm 以下で近接して分布していることから、SGCs とニューロンが強固な機能的相互作用を有する可能性がある。SGCs は活性化に伴って細胞体の膨化や突起の短縮などの形態変化を示すことが知られている<sup>7)</sup>。活性型 SGCs は glial fibrillary acidic protein(GFAP)免疫陽性を示すことが知られ<sup>6)</sup>、また connexin43(Cx43)を介して SGCs の活性化が TG 内に広まることが明らかにされている<sup>8)</sup>。これらの報告は、活性型 SGCs がニューロンと同様に様々な分子を放出して TG 内の広い領域に分布するニューロンの活動性に影響を与える可能性を示している。

Tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ )は末梢の炎症組織において產生される主要なサイトカインのひとつであり<sup>9,10)</sup>、炎症部のマクロファージから放出される TNF は TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$  およびリンホトキシン $\beta$  の 3 つサブタイプから構成されている<sup>11)</sup>。TNF- $\alpha$  は TNF 受容体と結合し、nuclear factor kappa B(NF $\kappa$ B)の核内移行に関与している。このことから TNF- $\alpha$  は、細胞免疫シス

(受付: 平成 29 年 1 月 26 日)

〒 101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

テムの重要な調節分子としての機能を有すると考えられる<sup>10)</sup>。TNF- $\alpha$ は神経節ニューロンからも放出され、グリア細胞に発現するTNF受容体と結合して神経細胞の興奮性に関与していることも明らかにされている<sup>12)</sup>。

以上のことから著者は、①TMJに炎症が引き起こされると、TGニューロンの活動性が亢進して神経節内にTNF- $\alpha$ の放出が促される。さらに、②放出されたTNF- $\alpha$ はSGCsの存在するTNF受容体と結合することによってSGCsの活性化を誘導する。③活性型SGCsは咬筋を支配するTGニューロンの活動性をさらに増加させ、これによって咬筋の機械痛覚過敏が誘導されるという仮説を立てた。

## 材料および方法

### 実験動物

本研究は日本大学歯学部動物実験委員会の承認を得(承認番号:AP15 D011),また動物の処置は米国国立予防衛生研究所および国際疼痛学会のガイドラインに従って行われた<sup>13)</sup>。実験には、体重200g~300gのSprague-Dawley系雄性ラット(7~9週齢)を用いた。実験動物は12時間の明暗サイクルの環境下、恒温室(23°C)で食物および水分摂取を制限することなく飼育した。

### TMJ炎症モデルの作製

2.5mg/kg butorphanol(Meiji Seika Pharma), 0.375mg/kg medetomidine(Zenoaq)および2.0mg/kg midazolam(Sandoz)を生理食塩水に溶解した三種混合麻酔薬の腹腔内投与によってラットを深麻酔した。生理食塩水に溶解した50% complete Freund's adjuvant(CFA)もしくは溶媒(生理食塩水)を頸骨弓後下方の皮膚直下の左側TMJに27ゲージの注射針を用いて25μlゆっくりと注入した(TMJ炎症群)。対照群は、溶媒を投与したもの用いた。

### 咬筋機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値(HWT)

処置5日前からケージの前壁に設置した小孔からラットが鼻先を5分間突き出していられるように訓練した<sup>8)</sup>。その後、TMJ炎症群ならびに対照群に対して先端が円形で平らなプローブのデジタルフォースゲージ(5mm; Attonic)を用いて、左側咬筋へ機械刺激を与えHWTを測定した。本実験では、ラットがいつでも刺激から逃避できる状況下でHWTの測定を行った。また、左側咬筋部を覆っている皮膚の機械刺激に対するHWTはファンフライフィラメント(Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical)を用いて測定した。咬筋と皮膚には機械刺激を5分間隔で3回与え、3回の平均値をHWTとして算出した。すべての行動観察実験は盲検条件下で行われた。なお、使用したラットに運動障害はみられなかった。

### 免疫組織化学染色

TMJへCFAを投与する4日前に、咬筋支配TG細胞を標識するため、生理食塩水にて溶解したFG(Fluorochrome)30μlを左側咬筋に27ゲージの注射針を用いて投与した。FG投与後3日目に、TMJ炎症群および対照群のラットを深麻酔して生理食塩水で脱血し、次いで0.1M PBS(phosphate buffered saline)で溶解した4% PFA(paraformaldehyde)にて灌流固定後、左側TGを取り出した。さらに20%スクロースに数日間浸漬した後にTissue Tek(Sakura Finetek)で包埋し、-20°Cで保存した。TGを矢状断で15μmの厚さに薄切り、組織切片標本を作成した。10切片ごとに1切片を取り、MAS-GPマイクロスライドグラス(Matsunami)に貼り付けて室温で一晩乾燥させた後、GFAPおよびTNF- $\alpha$ の発現を免疫組織化学的に解析した。

GFAPの免疫染色には、mouse anti-GFAP monoclonal antibody(1:1000; Merck Millipore), TNF- $\alpha$ の免疫染色には、rabbit anti-TNF- $\alpha$ (1:200; Abcam)を0.01M PBSに0.3% Triton X100を加えた4% Normal goat serum(NGS-PBS)で希釈したものを一次抗体として用い、切片をそれぞれの抗体に4°Cにて3日間培養した。0.01M PBSで洗浄後、一次抗体としてrabbit anti-TNF- $\alpha$ を用いたものにはAlexa Fluor 568 anti-rabbit IgG(1:200; Thermo Fisher Scientific)を、一次抗体としてmouse anti-GFAP monoclonal antibodyを用いたものに対してはAlexa Fluor 488 anti-mouse IgG(1:200; Thermo Fisher Scientific)を用いて室温で2時間培養した。切片を0.01M PBSで洗浄後、mounting medium(Thermo Fisher Scientific)で封入し、BZ-9000 system(Keyence)にて解析を行った。

各ラットのTGにおいてGFAPあるいはTNF- $\alpha$ を発現した細胞数を算出した(SensiveMeasure, Mitani)。FGで標識された全細胞のうち、FG標識細胞かつGFAPにより細胞周囲1/2以上囲まれた細胞またはTNF- $\alpha$ 陽性細胞の割合を解析した。

### 統計解析

結果を平均値±SEMで表した。統計解析は、それぞれの結果に対してStudent's t-testまたは、二元配置分散分析を行った後にBonferroniの多重比較検定を行った。統計学的解析後、 $p<0.05$ の場合、有意差ありと判定した。

## 結 果

### 咬筋および顔面皮膚の機械刺激に対するHWT

咬筋の機械刺激には直径5mmの先端が円形のプローブを用い、皮膚の機械刺激にはファンフライフィラメントを用いた<sup>14)</sup>。TMJ炎症群の咬筋機械刺激に対するHWTは対照群と比較して1日目から3日目で有意に低

下した(第1図A)。一方、対照群においては、投与後から7日目まで咬筋刺激に対するHWTの値に有意な変化は認められなかった(第1図A)。また、咬筋を覆う皮膚への機械刺激に対するHWTは、TMJ炎症群および対照群どちらも変化はみられなかった(第1図B)。

#### TMJ炎症群および対照群のTGにおけるSGCs活性

処置前にFGを咬筋に投与して、咬筋支配TG細胞を標識し、咬筋を支配するTG細胞を同定した。第2図AおよびDに示すようにFGを取り込んで青色に標識された多くのFG標識細胞がTGに認められた。FG標識細胞の多くは、核が抜けた円形の細胞体を有していた。また同時に、多くのGFAP陽性細胞を認めたが、これらは網様の形態学的特徴を示し、細胞体を取り囲むように存在していた(第2図B, C, EおよびF)。さらに、FG標識細胞の多くはGFAP陽性細胞の中に埋め込まれていた(第2図CおよびF)。TMJ炎症群と対照群におけるGFAP陽性細胞により囲まれたFG標識細胞数を比較すると、TMJ炎症群の方が対照群よりも有意に多かった(第2図G)。

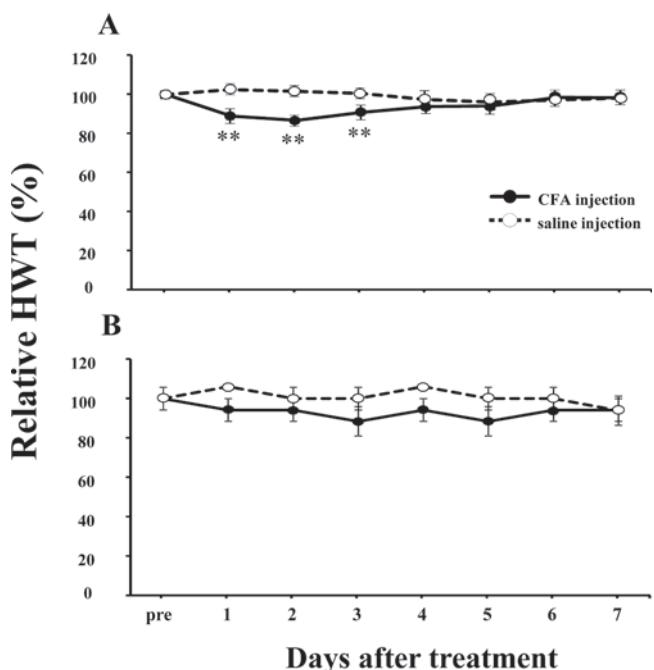
#### TGにおけるTNF- $\alpha$ 発現

第2図に示したものと同様、TMJ炎症群および対照群とも多くのFG標識細胞がTG内に認められた(AおよびDの矢頭)。一方、TNF- $\alpha$ 陽性細胞はTMJ炎症群において多数認められたのに対して対照群においてはほとんど検出されなかった(B: TMJ炎症群, E: 対照群)。第3図CおよびFにはFGで標識されたTNF- $\alpha$ 陽性細胞を示したが、TMJ炎症群においては多くのFG標識細胞がTNF- $\alpha$ 陽性を示した(第3図C)。一方、対照群においてFG標識細胞は観察されるもののTNF- $\alpha$ 陽性を示すFG標識細胞はほとんど観察されなかった(第3図F)。

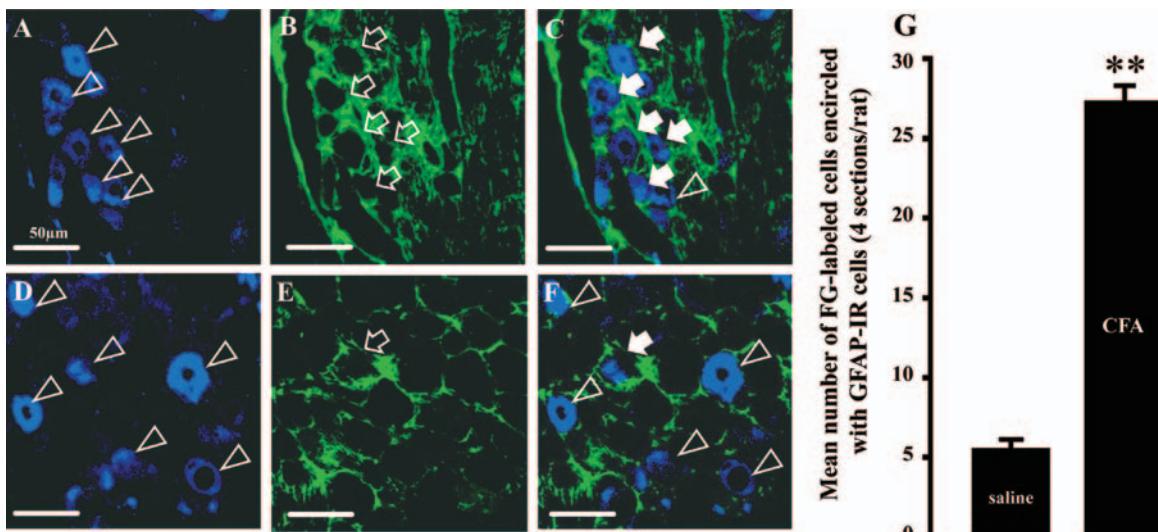
TMJ炎症群と対照群においてGFAP陽性を示すFG標識細胞数を比較すると、TMJ炎症群の方が対照群に比べ有意に多かった(第3図G)。

#### 考 察

多くのTMD患者はTMJの炎症、円板転移あるいは滑液の減少などが原因で頸関節痛を引き起こし、同時に咬筋痛を有している<sup>1,2)</sup>。本研究ではTMJの炎症による



第1図 咬筋および咬筋を覆う顔面皮膚への機械刺激に対するHWTの経日的变化



第2図 三叉神経節におけるGFAP陽性細胞に囲まれたFG標識細胞の組織標本写真と発現数の比較

咬筋痛のメカニズムを究明するため、TMJ 炎症モデルラットを用いて、SGCs 活性下における TNF- $\alpha$  の役割およびSGCs との相互関連を調べた。

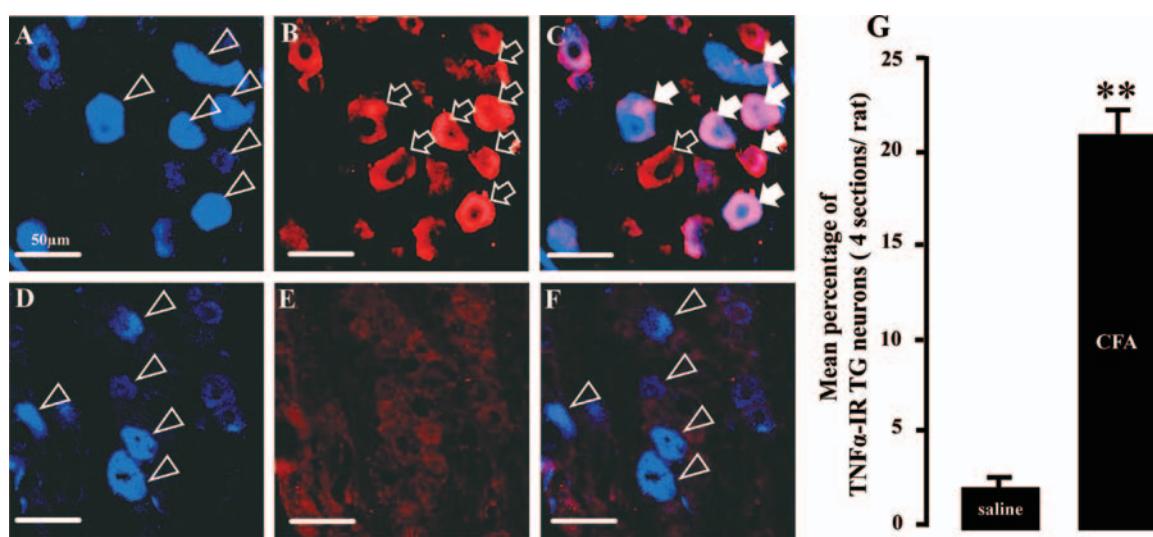
本研究では咬筋を顔面皮膚上から刺激するため、先端直径が大きいプローブを用いた。一方、皮膚表面の刺激には、その測定に適している先端直径の小さなフォンフライフィラメントを用いた<sup>14)</sup>。本研究では、TMJ 炎症群における咬筋への機械刺激に対する HWT は対照群に比較して有意に低下した。しかし、咬筋部表皮への機械刺激に対する HWT では両群間に有意な差は認められなかった。これらの結果は、TMJ 炎症は咬筋を覆う上皮ではなく咬筋そのものに機械痛覚過敏が引き起こされたことを示している。

TG ニューロンは、三叉神経損傷や口腔顔面の炎症時に興奮性が増大することが報告されている<sup>6,7,15)</sup>。また、TG ニューロンの細胞体は三叉神経損傷や口腔顔面の炎症が生じるとスパイク発火頻度の著しい増加を示す<sup>16)</sup>。高頻度スパイク応答は TG の細胞体で起こり、その結果 TG ニューロンはサブスタンス P、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)，神経成長因子(NGF)あるいはアデノシン三リン酸(ATP)などの分子を放出し、SGCs の活性化を促す<sup>17,18)</sup>。活性型 SGCs は GFAP 免疫陽性を示し、TG ニューロンの細胞体周囲を取り囲むように存在している<sup>6)</sup>。また活性型 SGCs は、いくつかの神経伝達物質と ATP を放出し、それらの分子は TG ニューロン活動性の調節に関与することが知られている<sup>7)</sup>。活性型 SGCs は舌神経の損傷、三叉神経第3枝の切断時にも、第2枝領域を越えた TG の広範な領域でみられる<sup>6)</sup>。著者は TMJ 炎症時に三叉神経第2枝を覆う広い領域で GFAP 陽性細胞を確認した。さらに、GFAP 陽性細胞に

より囲まれた TG 細胞の発現数は対照群と比較して TMJ 炎症群で有意に増加していた。これらの結果は、TMJ 炎症が三叉神経の第 2, 3 枝を覆う広域で SGCs の活性化を引き起こすことを示している。

TNF- $\alpha$  は、痛覚過敏を持続する一次神経の興奮性増強に関与する炎症性サイトカインとして知られている<sup>10)</sup>。末梢神経損傷や組織炎症が起こると TNF- $\alpha$  はマイクログリアやマクロファージだけでなく感覺神経節細胞においても発現が増加し、これらの細胞から放出されるといわれている<sup>9,11,19)</sup>。グリア細胞から放出された TNF- $\alpha$  は、感覺神経節細胞で TNF- $\alpha$  受容体と結合し、これらのニューロンの活性化に関与を亢進する。さらに、培養した感覺神経節細胞においては TNF- $\alpha$  で処理すると transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1) 発現が増加することが明らかになっている<sup>12)</sup>。先行研究によって、TNF- $\alpha$  の局所投与は投与側に熱および機械痛覚過敏を引き起こすこと、また TNF- $\alpha$  中和抗体による TNF- $\alpha$  阻害は熱痛覚過敏および機械痛覚過敏を軽減することが報告されている<sup>12,20,21)</sup>。著者は、TG 内での TNF- $\alpha$  発現と GFAP 陽性細胞発現の有意な増加を認めた。これらの結果は、TMJ 炎症時に SGCs の活性化が TG 内の広範囲で引き起こされ、炎症部位以外の非炎症部位を支配する広い領域に分布する TG ニューロンにおける TNF- $\alpha$  発現を増強することを示唆している。また、TG ニューロンでの TNF- $\alpha$  シグナル伝達は SGCs のさらなる活性化に関与する可能性もあると考えられる。

以上のことから、TNF- $\alpha$  シグナル伝達は、TMD に随伴して広い範囲で起こる口腔顔面の深部組織に生じた疼痛治療の標的となる可能性が示された。



第3図 三叉神経節における TNF- $\alpha$  陽性を示した FG 標識細胞の組織標本写真と発現数の比較

## 結 論

TMJ 炎症モデルラットにおいて、咬筋および顔面皮膚への機械刺激に対する HWT, TG における SGCs 活性ならびに TNF- $\alpha$  発現について検討し、以下の結論を得、第4図にまとめた。

1. TMJ 炎症群では対照群と比較して 1 日目から 3 日目まで咬筋への機械刺激に対する HWT は有意に低下した。
2. TMJ 炎症群および対照群とも顔面皮膚への機械刺激に対する HWT に変化はみられなかった。
3. 3 日目において、TMJ 炎症群では対照群と比較して GFAP 陽性 TG 細胞数が有意に多かった。
4. 3 日目において、TMJ 炎症群では対照群と比較して TNF- $\alpha$  陽性 TG 細胞数が有意に多かった。

以上から、TG での TNF- $\alpha$  を介した SGCs と TG ニューロン間の機能的相互作用が TMJ 炎症に関連した咬筋痛覚過敏に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

稿を終えるあたりに、本研究遂行に格別なるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部歯科補綴学第I講座の祇園白信仁教授に謹んで心より感謝申し上げます。

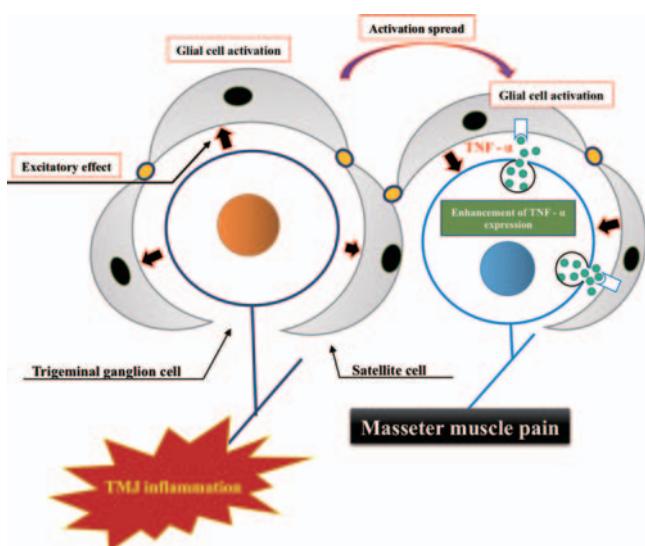
また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました、生理学講座の岩田幸一教授、篠田雅路准教授はじめ、生理学講座、歯科補綴学第I講座の皆様に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は、平成 24 - 26 年度日本大学大学院歯学研究科研究費(学生分)によってなされました。

本研究に関して、利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Hawkins JL, Durham PL(2016) Prolonged jaw opening promotes nociception and enhanced cytokine expression. *J Oral Facial Pain Headache* 30, 34-41.
- 2) Prasad SR, Kumar NR, Shruthi HR, Kalavathi SD(2016) Temporomandibular pain. *J Oral Maxillofac Pathol* 20, 272-275.
- 3) Moreno-Fernandez AM, Jimenez-Castellanos E, Iglesias-Linares A, Bueso-Madrid D, Fernandez-Rodriguez A, de Miguel M (2016) Fibromyalgia syndrome and temporomandibular disorders with muscular pain. A review. *Mod Rheumatol* 19, 1-22.
- 4) Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Ronald D, Ke R (1999) Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol* 82, 1244-1253.
- 5) Villa G, Ceruti S, Zanardelli M, Magni G, Jasmin L, Ohara PT, Abbracchio MP (2010) Temporomandibular joint inflammation activates glial and immune cells in both the trigeminal ganglia and in the spinal trigeminal nucleus. *Mol Pain* 6, 89.
- 6) Katagiri A, Shinoda M, Honda K, Toyofuku A, Sessle BJ, Iwata K (2012) Satellite glial cell P2Y12 receptor in the trigeminal ganglion is involved in lingual neuropathic pain mechanisms in rats. *Mol Pain* 8, 23.
- 7) Matsuura S, Shimizu K, Shinoda M, Ohara K, Ogiso B, Honda K, Katagiri A, Sessle BJ, Urata K, Iwata K (2013) Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation. *PLoS One* 8, e52840.
- 8) Kaji K, Shinoda M, Honda K, Unno S, Shimizu N, Iwata K (2016) Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury. *Mol Pain* 8, 12.
- 9) Wei XH, Zang Y, Wu CY, Xu JT, Xin WJ, Liu XG (2007) Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. *Exp Neurol* 205, 471-484.
- 10) Rothman SM, Huang Z, Lee KE, Weisshaar CL, Winkelstein BA (2009) Cytokine mRNA expression in painful radiculopathy. *J Pain* 10, 90-99.
- 11) Niu YL, Guo Z, Zhou RH (2009) Up-regulation of TNF-alpha in neurons of dorsal root ganglia and spinal cord during coronary artery occlusion in rats. *Cytokine* 47, 23-29.
- 12) Xu JT, Xin WJ, Zang Y, Wu CY, Liu XG (2006) The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain* 123, 306-321.
- 13) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 14) Takahashi K, Taguchi T, Itoh K, Okada K, Kawakita K, Mizumura K (2005) Influence of surface anesthesia on the pressure pain threshold measured with different-sized



第4図 本研究結果のまとめ

- probes. *Somatosens Mot Res* 22, 299-305.
- 15) Nakagawa K, Takeda M, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Matsumoto S, Kobayashi A, Sessle BJ, Shinoda M, Iwata K (2010) Alteration of primary afferent activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Mol Pain* 6, 9.
  - 16) Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, Kadoi J, Tsuboi Y, Honda K, Matsumoto S, Nakagawa H, Tanabe A, Iwata K (2006) Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *Eur J Neurosci* 24, 1976-1986.
  - 17) Tsujimura T, Shinoda M, Honda K, Hitomi S, Kiyomoto M, Matsuura S, Katagiri A, Tsuji K, Inoue M, Shiga Y, Iwata K (2011) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis, upper cervical cord, NTS and Pa5 following capsaicin injection into masticatory and swallowing-related muscles in rats. *Brain Res* 1417, 45-54.
  - 18) Iwata K, Imamura Y, Honda K, Shinoda M (2011) Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *Int Rev Neurobiol* 97, 227-250.
  - 19) Takahashi N, Kikuchi S, Shubayev VI, Campana WM, Myers RR (2006) TNF-alpha and phosphorylation of ERK in DRG and spinal cord: insights into mechanisms of sciatica. *Spine* 31, 523-529.
  - 20) Chatterjea D, Paredes L, Martinov T, Balsells E, Allen J, Sykes A, Ashbaugh A (2013) TNF-alpha neutralizing antibody blocks thermal sensitivity induced by compound 48/80-provoked mast cell degranulation. *F1000Res* 2, 178.
  - 21) Mizukoshi K, Sasaki M, Izumi Y, Miura M, Watanabe M, Amaya F (2013) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after plantar incision. *Neuroscience* 234, 77-87.