

論文の内容の要旨

氏名：鈴木安住

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：三叉神経節における MeCP2 を介した TRPV1 合成変調は炎症性舌痛覚過敏発症に關与する

メチル化 CpG 結合タンパク 2 (MeCP2) 遺伝子の突然変異によって引き起こされるレット症候群患者にみられる主要な症状として、呼吸機能の異常、様々な運動障害、自閉性障害および神経発達障害などがあげられる。MeCP2 は、主にニューロンに発現し、メチル化 CpG 結合ドメインおよび転写リプレッサードメインを介して作用する転写抑制因子であると考えられている。レット症候群の患者では痛覚鈍麻が報告されているが、このことは MeCP2 が侵害刺激に対する感受性において重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、炎症や末梢神経損傷のような病的条件下での、MeCP2 による痛みの調節機構は不明である。

一次ニューロンに発現する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) は、高温、低 pH、カプサイシン刺激によって開口する非特異性陽イオンチャンネルであり、侵害熱受容調節に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、MeCP2 が三叉神経節 (TG) ニューロンにおける TRPV1 チャンネルの発現調節に關与しているという仮説を立て、本研究において完全フロイントアジュバント (CFA) の注射により舌の炎症性モデルを作製し、舌の熱感受性や痛覚過敏発症に対する MeCP2 と TRPV1 の關係について検討した。

全身麻酔下にて 6 週齢の *Mecp2* ヘテロ欠損雌 (*Mecp2*^{+/-}) マウスおよび C57BL/6J 野生型雌 (wild) マウスの舌背に CFA を注射し、舌炎モデルを作製した。浅麻酔下にて、熱刺激用プローブを用い舌への熱刺激に対する逃避反射閾値 (HHWT) を経日的に計測した。さらに、あらかじめ逆行性トレーサーである Fluoro-Gold (FG) を舌に注射し、CFA 注射後 3 日目に三叉神経節における MeCP2 タンパクの半定量解析を行うとともに FG でラベルされた細胞における MeCP2 の発現変化を免疫組織化学的に解析した。同様に、三叉神経節の FG でラベルされた細胞における TRPV1 の発現変化を免疫組織化学的に解析した。そして、CFA 注射後に TRPV1 拮抗薬である SB36679, Transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) 阻害薬である liquiritigenin, および anoctamin 1 (ANO1) 阻害薬である T16Ainh-A01 を投与し、経時的に HHWT を測定した。さらに、CFA 注射後 3 日目における舌での TRPV1 タンパクの半定量解析を行った。

Wild マウスにおいて、生理食塩水を注射したマウスと比較し CFA を注射したマウスでは舌への熱刺激に対する HHWT が CFA 注射後 1 日目に有意に低下し (CFA: $39.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 生理食塩水: $50.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$)、この低下はその後 15 日目まで続いた。*Mecp2*^{+/-} マウスでは熱感受性が減弱しており ($54.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$)、CFA 注射後 3 日目で wild よりも HHWT が有意に高かった。さらに、wild マウスとは異なり、*Mecp2*^{+/-} マウスの舌への CFA 注射後 3 日目においても HHWT に変化が現れなかった ($54.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$)。また、wild マウスの TG における MeCP2 タンパク発現は生理食塩水を注射したマウスと比較して、CFA 注射後 3 日目に有意に増加していた (生理食塩水: 1.7 ± 0.2 , CFA: 2.8 ± 0.3 , β -actin をコントロールとしたタンパク量)。

CFA 注射後 3 日目の wild マウスにおいて、生理食塩水を注射したマウスおよび無処置の wild (naive) マウスと比較して FG でラベルされた MeCP2 陽性ニューロンが有意に増加した (naive: $29.9 \pm 0.4\%$, 生理食塩水: $31.0 \pm 0.4\%$, CFA: $57.4 \pm 2.5\%$)。一方、CFA を注射した *Mecp2*^{+/-} マウスにおける FG でラベルされた MeCP2 陽性ニューロンの比率は、naive マウスよりも有意に低かった (生理食塩水: $17.7 \pm 0.7\%$, CFA: $15.8 \pm 0.7\%$)。Wild マウスにおいて、CFA 注射後 3 日目の FG でラベルされた MeCP2 陽性 TG ニューロンを面積別に分類すると、0-200 μm^2 および 201-400 μm^2 のエリアの細胞群で細胞の比率が著しく増加したことが明らかになった ([0-200 μm^2] 生理食塩水: $1.4 \pm 0.4\%$, CFA: $4.9 \pm 1.1\%$, [201-400 μm^2] 生理食塩水: $15.4 \pm 1.3\%$, CFA: $38.5 \pm 1.6\%$)。

CFA を注射後 3 日目での wild マウスにおける, FG でラベルされた TRPV1 陽性ニューロンの比率は, 生理食塩水を注射したマウスまたは naive マウスと比較して増加していた (naive: $27.8 \pm 1.1\%$, 生理食塩水: $30.5 \pm 1.2\%$, CFA: $67.1 \pm 2.3\%$)。一方, 生理食塩水あるいは CFA を注射した *Mecp2*^{+/-} マウスにおける FG でラベルされた TRPV1 陽性ニューロンの比率は, naive マウスよりも有意に少なかった (生理食塩水: $20.2 \pm 1.2\%$, CFA: $19.8 \pm 0.4\%$)。Wild マウスにおいて, CFA 注射 3 日後 FG でラベルされた TRPV1 陽性 TG ニューロンを面積別に分類すると 201-400 μm^2 と 401-600 μm^2 のエリアの細胞群で細胞の比率が著しく増加していた ([201-400 μm^2] 生理食塩水: $8.5 \pm 2.9\%$, CFA: $25.7 \pm 2.3\%$, [401-600 μm^2] 生理食塩水: $6.9 \pm 1.1\%$, CFA: $28.6 \pm 1.8\%$)。CFA 注射後 3 日目の wild マウスにおいて, SB36679, liquiritigenin, T16Ainh-A01 の投与は CFA 注射による HHWT の有意な低下を抑制した。さらに, 舌における TRPV1 タンパクの発現を生理食塩水を注射したマウスと比較したところ, CFA 注射後 3 日目に有意に増加した (生理食塩水: 1.9 ± 0.2 , CFA: 3.5 ± 0.5)。一方, CFA を注射した *Mecp2*^{+/-} マウスにおける TRPV1 タンパク発現は, 生理食塩水を投与した wild よりも有意に少なかった (1.2 ± 0.1)。

以上のことから, MeCP2 の発現変化が TG ニューロンにおける TRPV1 発現調節に関与している可能性が示された。MeCP2 欠損における疼痛感受性低下のメカニズムのさらなる解明は, レット症候群の病因に新たな光を当てるとともに, レット症候群患者の痛みの痛覚鈍麻に対する治療法の開発に役立つと考えられる。