

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関与する

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

鈴木安住

(指導：白川哲夫 教授，岩田幸一 教授，篠田雅路 准教授)

目次

	ページ
概要	2-6
緒言	7-8
材料及び方法	9-14
成績	15-19
考察	20-24
結論	25
謝辞	26
参考文献	27-33

概要

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関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 の関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。

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 $201-400 \mu\text{m}^2$ と $401-600 \mu\text{m}^2$ のエリアの細胞群で細胞の比率が著しく増加していた ([$201-400 \mu\text{m}^2$] 生理食塩水: $8.5 \pm 2.9\%$, CFA: $25.7 \pm 2.3\%$, [$401-600 \mu\text{m}^2$] 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。

なお, 本論文は Suzuki A, Shinoda M, Honda K, Shirakawa T, Iwata K, Regulation of transient receptor potential vanilloid 1 expression in trigeminal ganglion neurons via

Methyl-CpG binding protein 2 signaling contributes tongue heat sensitivity and inflammatory hyperalgesia in mice. *Molecular Pain*. in press. を基幹論文とし、これに新たなデータとして炎症性熱痛覚過敏症への TRPV1 拮抗薬の影響および舌における TRPV1 の発現変化を加え総括したものである。

緒言

レット症候群は、X染色体上にあるメチル化 CpG 結合タンパク 2 (methyl-CpG binding protein 2, MeCP2) の突然変異より女兒に発症する¹⁾。レット症候群の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、言語障害および自閉性障害があげられる²⁾。MeCP2 は、主にニューロンに発現し標的遺伝子の発現レベルを調節する^{3, 4)}。そして、メチル化 CpG-結合ドメイン (MBD) と転写リプレッサードメインを介してDNAに作用しクロマチン構造を変化させる⁵⁻⁸⁾。さらに、レチノイン酸の核内受容体コリプレッサーサイレンシングメディエーターや甲状腺ホルモン受容体コリプレッサー複合体を補充することによって転写を抑制する。また、MeCP2 はマイクロ RNA プロセッシングを調節する Y ボックス転写因子との相互作用を介して選択的スプライシングを調節する⁹⁾。

レット症候群の患者において、MeCP2 が疼痛感受性に重要な役割を果たしており、皮膚の痛みに対する鈍麻作用があると報告されている¹⁰⁾。一方、口腔粘膜の熱および機械刺激感受性は、皮膚とは異なることが報告されており^{11, 12)}、一次求心性神経細胞における侵害受容機構が異なる可能性が示されている¹³⁾。このことから、口腔粘膜と皮膚における痛覚受容機構に対して、MeCP2 が異なるメカニズムで関与する可能性が考えられる。しかし、MeCP2 が口腔粘膜の痛み受容および病的条件下での疼痛調節に対していかなるメカニズムで関与する

かは不明である。

また、主に一次求心性線維に発現する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) は、高温、pH の変化および炎症などの侵害刺激によって活性化されることから疼痛の調節に関与する重要な分子の一つである¹⁴⁻¹⁷⁾。過去の研究において、顔の皮膚へのテレピン油の注入¹⁸⁾ や咬筋への完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant, CFA) の投与¹⁹⁾、リポ多糖の象牙質応用²⁰⁾ によって一次求心性線維末端における TRPV1 陽性 TG ニューロンの数および TRPV1 の発現増加が誘導され、結果的に口腔顔面熱痛覚過敏が生じることが知られている。以上のことから、我々は MeCP2 が口腔粘膜の炎症に関連して TG ニューロンにおける TRPV1 チャンネルの発現の調節に関与しているという仮説を立てた。

そこで本研究では、CFA の注射により舌の炎症性モデルを作製し、舌の熱痛覚および熱性痛覚過敏における MeCP2 の役割を調べた。

材料と方法

1. 実験動物

本研究で使用した *Mecp2* ヘテロ雌 ($Mecp2^{+/-}$) マウスは (20-30 g) は野生型 C57BL/6 雄マウス (Jackson Laboratory) ならびに *Mecp2* ヘテロ欠損雌マウス (B6.129P2(C)-*Mecp2*^{tm1.1Bird/J}, Jackson Laboratory) を交配することにより得た。マウスの遺伝型は、Jackson Laboratory プロトコールに従って、生後 10 日目に *Mecp2* 遺伝子のためのポリメラーゼ連鎖反応によって判定した。対照として野生型 C57BL/6 雌 (wild) マウスを使用した。マウスの飼育環境は 12 時間の明/暗サイクル (7 時 00 分に点灯) にて、食物および水は自由摂取とし、温度と湿度を一定 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$) に維持した。実験は日本大学の動物実験委員会の許可を得、実験動物の取り扱い、日本大学動物委員会の指針に従って行った。また、使用したマウスの数は、統計分析のために必要な最小限とした。

2. 性周期

マウスにおける性周期の確認は、1.5%のイソフルラン (Mylan) による浅麻酔下にてインピーダンスリーダーMK-10B (Muromachi) を用いて膣の電気インピーダンス (EIV) を測定し判定した。発情前期では EIV が 3000Ω 以上となり、発情後期においては EIV が 3000Ω 以下となることから性周期を判定した²¹⁾。

3. 舌炎モデルマウスの作製

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の腹腔内投与による全身麻酔下にて、CFA または生理食塩水をハミルトンシリンジに取り付けた 30 ゲージの針を用いて、舌の前方側背 2/3 の左側粘膜下に 2 μ l 注入した。針の挿入部位は、舌粘膜層に局限した。注入後、マウスの体重増減を記録することによって動物の健康状態をチェックした。

4. 熱刺激に対する逃避反射閾値の測定

1.5%イソフルラン浅麻酔下にて、前述した舌の薬物注入部位に熱刺激用プローブ (25 mm², Intercross) を当てて熱刺激 (35 to 55°C, 1°C/sec, cutoff: 60°C) を与えた¹³⁾。マウスの麻酔レベルは後肢に対する機械刺激により弱い屈曲反射が引き起こされる深度とし、その後 1.5%のイソフルランの吸入を止め、直後に熱刺激を与えた。熱刺激により頭部の引っ込め反射が引き起こされる最低温度を熱逃避反射閾値 (heat head-withdrawal reflex threshold, HHWT) とした。HHWT は、刺激間隔を 1 分とし 3 回ずつ行った平均値とした。また、すべての HHWT の測定は盲検条件下で行った。

5. 舌支配三叉神経節 (TG) 細胞における TRPV1, MeCP2, transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3), anoctamin 1 (ANO1), acetyl-histone H3 の免疫組織化学染色

CFA 注射 5 日前に、生理食塩水に溶解した逆行性トレーサー (5%, Fluoro-Gold

[FG], Fluorochrome) 5 μ l を 30 ゲージの針を用いて左側舌粘膜層に投与し, TG における舌投射ニューロンをラベルした。CFA 注射後 3 日目にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の腹腔内投与による深麻酔下を施し, 生理食塩水にて脱血後, リン酸緩衝 (PB) 4%パラフォルムアルデヒド固定液 (pH 7.4) を用いて灌流固定を行った。

灌流後, CFA 注射と同側の TG を摘出し, 同固定液に保存し (8 時間, 4°C), その後 0.01 M リン酸緩衝食塩水 (PBS) を含有する 20%スクロースに移し 12 時間浸漬した。その後摘出した TG を, Tissue Tek (Sakura Finetek) に凍結包埋し 16 μ m の厚さで薄切し, 100 μ m ごとに MAS-coated Superfrost Plus microscope slides (Matsunami) に張り付けた。TG 切片を 0.01 M PBS で洗浄後, MeCP2, TRPV1, TRPM3, ANO1, acetyl-histone H3 の発現を見るため, 一次抗体として rabbit anti-MeCP2 polyclonal antibody (1:1000, Millipore), guinea pig anti-TRPV1 polyclonal antibody (1:1000, Millipore), anti-TRPM3 polyclonal antibody (1:200, Alomone), anti-transmembrane member (TMEM) 16A antibody (1:1, Abcam) または anti-acetyl-histone H3 antibody (1:400, Cell signaling) を 4%ヤギ血清と 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) にて希釈し, 4°C で 48 時間反応させた。その後 TG 切片を二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:200, Thermo Fisher Scientific) または Alexa Fluor 568 goat anti-guinea pig IgG (1:200, Thermo Fisher

Scientific) を 0.01 M PBS に希釈して 120 分反応させた。0.01 M PBS で洗浄後、TG 切片を PermaFluor (Sigma-Aldrich) を用いて封入し、蛍光顕微鏡下で調べた。さらに、BZ-9000 system (Keyence) を用いて FG でラベルされた Alexa Fluor 488 陽性または Alexa Fluor 568 陽性ニューロンを観察し、二重染色された細胞またはバックグラウンドの平均よりも高い染色強度を有するニューロンを陽性とみなした。なお、陽性反応は、一次抗体の非存在下では観察されなかった。

以下の式にしたがって FG でラベルされた MeCP2, TRPV1, TPPM3 および ANO1 陽性ニューロンの割合を算出した。(FG でラベルされた MeCP2, TRPV1, TPPM3 または ANO1 陽性ニューロン / FG でラベルされたニューロンの総数) × 100。さらに、FG でラベルされた MeCP2 または TRPV1 陽性ニューロン面積の計測を行った。

6. ウェスタンブロット

Wild マウスの舌に CFA または生理食塩水注射後 3 日目にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の腹腔内投与による深麻酔下で、生理食塩水にて灌流した。TG および舌を取り出し、各々をチューブ乳棒 (Thermo Fisher Scientific) を用いて溶解緩衝液 (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% NP-40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml proteinin, 1 g/ml leupeptin, 0.5 mM sodium vanadate) 50 µl とともににホモジナイズして均一な懸濁状態にし

た。4°C で 10 分間, 15,000 rpm でサンプルを遠心分離した後, 上清を回収しタンパク濃度をタンパクアッセイキット (Bio-Rad, Hercules) を用いて測定した。上清を, Laemmli sample buffer (Bio-Rad) 中で熱変性し, サンプル 20 μ l を 10% SDS-PAGE で電気泳動し, Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) を使用しメンブレン (Trans-Blot Turbo Transfer pack, Bio-Rad) に転写した。その後メンブレンを 0.1% の Tween20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBST) で洗浄し, 3%ウシ血清アルブミン (BSA, Bovogen) と共にインキュベートした。次いで, メンブレンを 5% BSA を含む TBST で希釈した rabbit anti-MeCP2 polyclonal antibody (1:1000, Millipore) または rabbit anti-TRPV1 (1:200, alomone labs) と共に 4°C で一晩インキュベートした。結合した抗体を horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Cell Signaling) および Western Lightning ELC Pro (Perkin Elmer) を用いて可視化した。バンド強度はストリッピング試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて結合抗体を除去後, β -actin 免疫反応性を抗 β -actin 抗体で再度ブロットし正規化して, Chemi Doc MP システム (Bio-Rad) を用いて定量した。

7. 熱痛覚過敏による TRPM3, ANO1 阻害薬および TRPV1 拮抗薬の効果

TRPM3 阻害薬 (1 μ l, 1 mM; liquiritigenin), ANO1 阻害薬 (1 μ l, 1 mM; T16Ainh-A01) または TRPV1 阻害薬 (1 μ l, 1 mM ; SB366791, Siguma-aldrich) を, 生理食塩水で希釈した 50%ジメチルスルホキシドに溶解した。CFA 注射後 3 日

目に liquiritigenin, T16Ainh-A01 または SB366791, 5 μ l を 27 ゲージの針を用いて, 1.5%イソフルラン浅麻酔下にて wild マウスの舌の粘膜下に投与した。先記のように HHWT を阻害薬および拮抗薬の投与前, 投与後 0, 30, 60, 90 および 120 分後に測定した。

8. 統計

データは, 平均値 \pm 標準誤差として表した。統計分析は, Student's *t*-test 一元配置分散分析 (ANOVA) と Bonferroni's multiple-comparison tests, または二元配置分散分析と Dunnett's multiple-comparison tests の組み合わせによって行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

成績

1. 舌への熱刺激に対する HHWT の変化

本研究では雌マウスを使用しているため、まず舌の疼痛閾値が性周期によって変化するかを調べた。性周期によって雌マウスにおける舌の HHWT の有意差は見られなかった (データは示さず)。

舌粘膜下への CFA 投与後、2 週間発赤を伴う炎症性舌炎を誘発した (データは示さず)。Wild マウスでは、CFA 注射後 1 日目に舌の熱刺激に対する HHWT が生理食塩水を注射したマウスと比較して有意に減少した (CFA: $39.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 生理食塩水: $50.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$)(第 1 図)。その後 15 日目まで有意に低いままであった ($P < 0.01$)。Mecp2^{+/-}マウスでは、熱感受性が減少しており wild マウスよりも HHWT が有意に高かった。さらに、wild マウスと異なり Mecp2^{+/-}マウスの舌への CFA 注射後も HHWT に変化が現れなかった。実験で使用したすべてのマウスにおいて、運動神経障害と認知障害は認められなかった (データは示さず)。

2. 舌における TRPV1 陽性および MeCP2 陽性 TG ニューロン

Wild および Mecp2^{+/-}マウスに CFA または生理食塩水注射後 3 日目において、FG でラベルされた TRPV1 および MeCP2 陽性 TG ニューロンの発現が認められた (第 2 図)。また、wild マウスに CFA を投与して 3 日経過すると、FG でラベルされたアセチル化ヒストン H3 陽性ニューロンの発現も認められた。さらに、

wild および *Mecp2*^{+/-} マウスで, CFA または生理食塩水注射後 3 日目に FG でラベルされたニューロンの総数をカウントしたところ, 両者に有意な差は認められなかった (データは示さず)。

3. TG ニューロンにおける MeCP2 の発現の変化

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に比較して, 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)(第 3 図)。さらに本研究では, CFA または生理食塩水注射後 3 日目において舌を支配する TG ニューロンでの MeCP2 免疫反応性を調べた。Wild マウスにおいて, FG でラベルされた MeCP2 陽性ニューロンの数は, 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 CFA を注射したマウスにおいて有意に増加した (naive: $29.9 \pm 0.4\%$, 生理食塩水: $31.0 \pm 0.4\%$, CFA: $57.4 \pm 2.5\%$)(第 4 図 A)。一方, 生理食塩水および CFA を注射した *Mecp2*^{+/-} マウスにおいて FG でラベルされた MeCP2 陽性ニューロン数は, naive マウスよりも有意に少なかった (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 ニューロンの細胞体の面積を計測した結果, CFA を注射したマウスの方が生理食塩水を注射したマウスに比べて $0-200 \mu\text{m}^2$ および $201-400 \mu\text{m}^2$ の細胞群が有意に増加したことが明らかになった ($[0-200 \mu\text{m}^2]$ 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: $38.5 \pm 1.6\%$)(第 4 図 B)。一方, FG でラベルされた MeCP2 陽性ニューロン数は, CFA 投与後 3 日での Mecp2^{+/-} マウスにおける全ての細胞群において, 生理食塩水群と CFA 群の間で有意差は認められなかった ([201-400 μm^2] 生理食塩水: $10.4 \pm 0.9\%$, CFA: $9.1 \pm 0.5\%$, [401-600 μm^2] 生理食塩水: $2.3 \pm 0.4\%$, CFA: $2.3 \pm 0.4\%$, [601-800 μm^2] 生理食塩水: $0.8 \pm 0.2\%$, CFA: $0.5 \pm 0.1\%$)。また, 生理食塩水および CFA を注射した Mecp2^{+/-}マウスでは, 201-400 μm^2 , 401-600 μm^2 , 601-800 μm^2 のエリアの FG でラベルされた MeCP2 陽性ニューロン数が wild マウスに生理食塩水を注射したものと比較して有意に少なかった。

4. TG ニューロンにおける TRPV1 発現の変化

CFA または生理食塩水注射後 3 日目において, TG での TRPV1 陽性細胞の存在について調べた。Wild マウスにおいて, FG でラベルされた TRPV1 陽性ニューロンの数は, CFA を注射したマウスの方が生理食塩水を注射したマウスまたは naive マウスと比較して有意に増加していた (naive: $27.8 \pm 1.1\%$, 生理食塩水: $30.5 \pm 1.2\%$, CFA: $67.1 \pm 2.3\%$)(第 4 図 C)。一方, CFA および生理食塩水を注射した Mecp2^{+/-}マウスにおける FG でラベルされた TRPV1 陽性ニューロン数は, 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 注射後 3 日目の FG でラベルされた TRPV1 陽

性 TG ニューロンの面積を計測すると 201-400 μm^2 および 401-600 μm^2 のエリアの細胞群で有意に増加していた ([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: $28.6 \pm 1.8\%$)(第 4 図 D)。

一方, CFA 注射 3 日後の *Mecp2*^{+/-} マウスにおける全ての細胞群において, FG でラベルされた TRPV1 陽性ニューロン数は, 生理食塩水注射したマウスと比較して有意な違いは認められなかった。また, 生理食塩水および CFA を注射した *Mecp2*^{+/-} マウスでは, 601-800 μm^2 の FG でラベルされた TRPV1 陽性ニューロンの数が wild マウスに生理食塩水を注射したものと比較して有意に少なかった ([601-800 μm^2] 生理食塩水: $1.3 \pm 1.0\%$, CFA: $1.7 \pm 0.4\%$)。

5. 熱痛覚過敏における TRPM3 と ANO1 の関与

Wild マウスに CFA または生理食塩水注射後 3 日目において, FG でラベルされた TRPM3 陽性 TG ニューロンが多数検出された (第 5 図 A)。FG でラベルされた TRPM3 陽性ニューロン数は, 生理食塩水を注射した wild マウスに比較して CFA 注射した wild マウスでは有意に増加していたのに対し, *Mecp2*^{+/-} マウスでは有意な減少を示した (第 5 図 B)。TRPM3 の阻害薬である liquiritigenin の投与は HHWT の低下を抑制し, その抑制効果は投与後 90 分まで持続した (第 5 図 C)。

また, 同様に wild マウスに生理食塩水または CFA 注射後 3 日目においても,

FG でラベルされた ANO1 陽性 TG ニューロンが検出された (第 5 図 D)。FG でラベルされた ANO1 陽性 TG ニューロン数は生理食塩水を注射した wild マウスと比較して, CFA を注射した wild マウスでは有意に減少したが, *Mecp2*^{+/-}マウスでは有意な増加を認めた (第 5 図 E)。ANO1 の阻害薬である T16Ainh-A01 の投与は HHWT の低下を抑制し, その効果は投与後 60 分まで持続した (第 5 図 F)。

6. 炎症性熱過敏症の TRPV1 拮抗薬の影響

Wild マウスに CFA 注射後 3 日目において, HHWT が有意に低下した。その後 TRPV1 の拮抗薬である SB366791 を投与すると, HHWT の低下は有意に抑制された。SB366791 の抑制効果は, 投与後 30 分でピークに達した (第 6 図)。

7. 舌における TRPV1 の発現変化

Wild マウスの舌における TRPV1 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: 1.9 ± 0.2 , CFA: 3.5 ± 0.5)。一方, CFA を注射した *Mecp2*^{+/-}マウスにおける TRPV1 タンパクの発現量は, 生理食塩水を注射した wild マウスよりも有意に少なかった ($1.2 \pm 0.1\%$)(第 7 図)。

考察

レット症候群は、メチル化 CpG を介して作用する転写抑制因子であると考えられる *MECP2* の遺伝子変異を原因として女性に発症することが知られており、呼吸機能の異常、様々な運動障害、言語障害および自閉性障害を引き起こすことが知られているが、同時にこれらの患者は痛覚鈍麻を有することが報告されている^{5,10,22)}。

総腓骨と脛骨神経損傷による機械痛覚過敏モデル動物において、後根神経節 (DRG) ニューロンで MeCP2 が増加することが報告されており、病的条件下で疼痛伝達の調節には MeCP2 が関与する可能性が考えられている²³⁾。

熱痛覚は、主に一次感覚ニューロンにおける TRPV ファミリーによって引き起こされる¹⁶⁾。以前の研究では、TRPV1 陽性ニューロンは、組織の切開によって発現数が有意に増加し、TRPV1 拮抗作用は熱過敏症の有意な抑制をもたらした¹³⁾。一次求心性ニューロンにおける TRPV1 の過剰発現は、炎症性熱痛覚過敏を誘発する²⁴⁾。また、TRPV1 を欠損したマウスでは、後肢での熱引っ込め反射時間が延長し、一次ニューロンの復元による TRPV1 の再発現によって、反射時間が通常に戻った²⁵⁾。これらの研究は、一次ニューロンの熱刺激部位の熱に対する感度が TRPV1 チャンネルの量に大きく依存することを示している。TRPV1 は、主に一次求心性線維末端における末梢性炎症に関連して発現が増加するこ

と、さらに炎症組織における熱過敏は、髄腔内、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の中和抗体によって減少することが知られている²⁶⁾。本研究では、舌への CFA 投与により wild マウスでは熱感受性の上昇、Mecp2^{+/-}マウスでは舌炎発症後、熱痛覚鈍麻を認めた。

TRPV1 は、wild と Mecp2^{+/-}マウスの両方で MeCP2 陽性 TG ニューロンにおいて発現していたが、wild マウスに比較して Mecp2^{+/-}マウスで検出される TRPV1 陽性 TG ニューロン数が少なかった。これらの結果は、熱痛覚鈍麻が MeCP2 シグナリングに依存する TRPV1 発現の阻害によって誘導されることを示唆している。

MeCP2 は選択的にメチル化 DNA に結合し、ヒストン脱アセチル化を促進する HDAC と複合体を形成する²⁷⁾。また、MeCP2 は、ヒストン脱アセチル化を介して遺伝子発現を調節する転写抑制因子である²⁸⁾。したがって、多くの研究において MeCP2 が転写における重要な役割を果たしていることが示されている²⁷⁾。さらに、最近の研究で MeCP2 には転写抑制因子としての機能だけではなく、転写活性因子としての役割もあることが明らかになっている²⁹⁾。本研究において、舌の CFA の注射によって wild マウスでは熱痛覚過敏が誘導されたのに対し、Mecp2^{+/-}マウスにおいては変化が認められなかった。加えて、TRPV1 は wild マウスでは CFA の注射によりほとんどすべての MeCP2 陽性 TG ニューロンが発現

していた。また, wild マウスでは, CFA の注射により MeCP2 陽性, TRPV1 陽性 TG ニューロン数および MeCP2 タンパクが増加していたのに対し, Mecp2^{+/-} マウスでは変化が認められなかった。一方, wild マウスへの CFA 注射後ほとんどの TG ニューロンにおいて, アセチル化ヒストン H3 が発現していた。以上のことより, ヒストン H3 脱アセチル化および MeCP2 の増加により TRPV1 の発現増加が起こり, 結果として舌に痛熱覚過敏が発症することが示唆された。

また, TG ニューロンはその細胞体の面積の違いから, C 線維 (<400 μm^2), A δ 線維 (401-600 μm^2), A β 線維 (>601 μm^2) のニューロンに分類されている³⁰⁾。CFA 注射後, MeCP2 陽性 TG ニューロンは小型細胞群でのみ増加し (<400 μm^2), TRPV1 陽性 TG ニューロンは小型から中型の細胞群で増加した (<400 μm^2 , 401-600 μm^2)。一方, Mecp2^{+/-} マウスにおいては, MeCP2 陽性ニューロン数は, wild マウスのものより小型, 中型, 大型細胞 (<400 μm^2 , 401-600 μm^2 , >601 μm^2) の全てにおいて有意に少なかったが, 唯一大型細胞 (>601 μm^2) において数は少ないが TRPV1 陽性を示すものが観察された。さらに厳密な実験が必要だが, 本データは TG ニューロンにおける TRPV1 発現の変化が, MeCP2 シグナル伝達に関与していることを示唆している。

ANO1 は, DRG ニューロンで発現し 44 °C 以上の熱刺激によって活性化するといわれている³¹⁾。また, TRPV1 には高いカルシウム透過性および TRPV1 の

活性による Ca^{2+} 流入作用がある³²⁾。ほとんどの ANO1 陽性 TG ニューロンは TRPV1 を発現していることから、ANO1 の活性化は TRPV1 によるカルシウムの流入を介して引き起こされると考えられている^{33,34)}。

ANO1 欠損マウスにおいて、炎症性疼痛行動が減弱していることから、ANO1 が炎症性疼痛に関与している可能性があると考えられている³⁵⁾。また、DRG および TG 大型ニューロンにおいて、 Ca^{2+} 透過性非選択的イオンチャネルである TRPM3 が発現している³⁶⁾。一方、TRPM3 ノックアウトマウスでは、侵害的熱刺激に対する反応が起こされず、また熱性過敏症も発症しなかった³⁶⁾。

この研究において、wild マウスに CFA を注射することにより TRPM3 陽性 TG ニューロン数が有意に増加し、TRPM3 阻害薬により熱痛覚過敏が抑制された。また、CFA 注射により ANO1 陽性ニューロン数は有意に減少し、ANO1 阻害薬によって熱痛覚鈍麻が引き起こされた。しかし、TRPM3 陽性および ANO1 陽性 TG ニューロン数の変化は、*Mecp2*^{+/-} マウスでは起こらなかった。以上のことより、MeCP2 は TG ニューロンにおいて TRPM3 および ANO1 の発現変化に関与していることが示唆された。CFA 注射による ANO1 の発現低下および *Mecp2*^{+/-} マウスにおける ANO1 増加の直接的な関係は不明であり、さらなる研究が必要であると考えられる。

最後に、舌は多様な神経支配を受けており、主な機能は味覚である。培養し

た DRG ニューロンにおいて、マイクロ RNA によって MeCP2 を減少させると BDNF の発現が減少することが知られている³⁷⁾。また、BDNF が味蕾細胞の神経支配を調節することが明らかにされている³⁸⁾。本研究を含むこれらの報告から、舌の熱感受性にたいして MeCP2 が TRPV1 発現を介して極めて重要な役割を果たしているだけでなく、舌での味覚受容にも関与している可能性があると推測される。

結論

舌の熱性痛覚過敏に対する *Mecp2* の役割を解明するために、舌への CFA 注射により舌炎を発症させた *Mecp2*^{+/-}マウスを用いて、行動学的、形態学的および生化学的研究を行った結果 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覚鈍麻のための新たな治療法の開発に役立つと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究遂行に格別なるご指導ご鞭撻を賜りました，日本大学歯学部小児歯科学講座の白川哲夫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，篠田雅路准教授をはじめ，小児歯科学講座および生理学講座の皆様

様に深く感謝いたします。

なお，本研究は私立大学戦略的基盤支援事業および日本大学大学院研究科研究費(学生研究費)によってなされました。

参考文献

- 1) Amir R E, Van den Veyver I B, Wan M, Tran C Q, Francke U and Zoghbi H Y (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188.
- 2) Chahrour M and Zoghbi H Y (2007) The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422-437.
- 3) Hite K C, Adams V H and Hansen J C (2009) Recent advances in MeCP2 structure and function. *Biochem Cell Biol* 87, 219-27.
- 4) Kishi N and Macklis J D (2004) MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci* 27, 306-321.
- 5) Nan X, Campoy F J and Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-481.
- 6) Theisen J W, Gucwa J S, Yusufzai T, Khuong M T and Kadonaga J T (2013) Biochemical analysis of histone deacetylase-independent transcriptional repression by MeCP2. *J Biol Chem* 288, 7096-7104.

- 7) Bienvenu T and Chelly J (2006) Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7, 415-426.
- 8) Lombardi L M, Baker S A and Zoghbi H Y (2015) MECP2 disorders: from the clinic to mice and back. *J Clin Invest* 125, 2914-2923.
- 9) Lyst M J and Bird A (2015) Rett syndrome: a complex disorder with simple roots. *Nat Rev Genet* 16, 261-75.
- 10) Downs J, Geranton S M, Bebbington A, Jacoby P, Bahi-Buisson N, Ravine D and Leonard H (2010) Linking MECP2 and pain sensitivity: the example of Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 152a, 1197-1205.
- 11) Green B G and Gelhard B (1987) Perception of temperature on oral and facial skin. *Somatosens Res* 4, 191-200.
- 12) Komiyama O and De Laat A (2005) Tactile and pain thresholds in the intra- and extra-oral regions of symptom-free subjects. *Pain* 115, 308-315.
- 13) Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Ito R, Gionhaku N and Iwata K (2015) Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. *J Dent Res* 94, 446-454.
- 14) Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, Rosen T A, Levine J

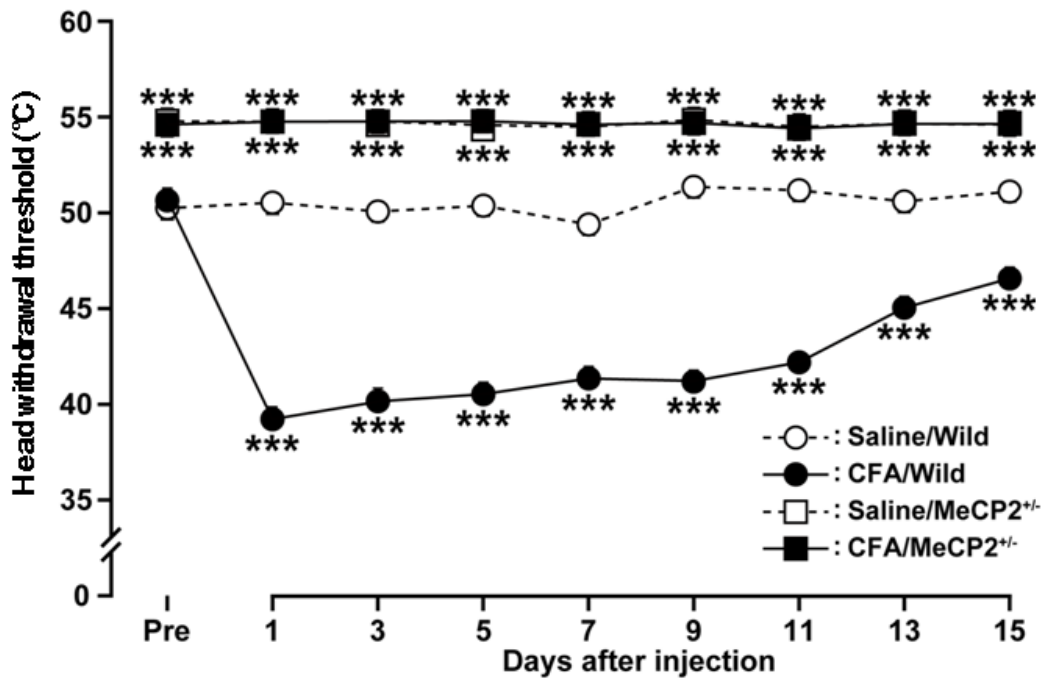
- D and Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- 15) Tominaga M, Caterina M J, Malmberg A B, Rosen T A, Gilbert H, Skinner K, Raumann B E, Basbaum A I and Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.
- 16) Tominaga M and Caterina M J (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61, 3-12.
- 17) Morales-Lazaro S L, Simon S A and Rosenbaum T (2013) The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J Physiol* 591, 3109-3121.
- 18) Pei L, Lin C Y, Dai J P and Yin G F (2007) Facial pain induces the alteration of transient receptor potential vanilloid receptor 1 expression in rat trigeminal ganglion. *Neurosci Bull* 23, 92-100.
- 19) Simonic-Kocijan S, Zhao X, Liu W, Wu Y, Uhač I and Wang K (2013) TRPV1 channel-mediated bilateral allodynia induced by unilateral masseter muscle inflammation in rats. *Mol Pain* 9, 68.
- 20) Chung M K, Lee J, Duraes G and Ro J Y (2011)

- Lipopolysaccharide-induced pulpitis up-regulates TRPV1 in trigeminal ganglia. *J Dent Res* 90, 1103-1107.
- 21) Koto M, Miwa M, Togashi M, Tsuji K, Okamoto M and Adachi J (1987) [A method for detecting the optimum day for mating during the 4-day estrous cycle in the rat; measuring the value of electrical impedance of the vagina]. *Jikken Dobutsu* 36, 195-198.
- 22) Kudo S (1998) Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* 18, 5492-5499.
- 23) Wang Y, Liu C, Guo Q L, Yan J Q, Zhu X Y, Huang C S and Zou W Y (2011) Intrathecal 5-azacytidine inhibits global DNA methylation and methyl-CpG-binding protein 2 expression and alleviates neuropathic pain in rats following chronic constriction injury. *Brain Res* 1418, 64-69.
- 24) Shinoda M, Asano M, Omagari D, Honda K, Hitomi S, Katagiri A and Iwata K (2011) Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain. *J Neurosci* 31, 7145-7155.

- 25) Walder R Y, Radhakrishnan R, Loo L, Rasmussen L A, Mohapatra D P, Wilson S P and Sluka K A (2012) TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation. *Pain* 153, 1664-1672.
- 26) Xia C M, Gulick M A, Yu S J, Grider J R, Murthy K S, Kuemmerle J F, Akbarali H I and Qiao L Y (2012) Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in primary afferent pathway regulates colon-to-bladder cross-sensitization in rat. *J Neuroinflammation* 9, 30.
- 27) Miao C G, Yang Y Y, He X and Li J (2013) New advances of DNA methylation and histone modifications in rheumatoid arthritis, with special emphasis on MeCP2. *Cell Signal* 25, 875-882.
- 28) Zocchi L and Sassone-Corsi P (2012) SIRT1-mediated deacetylation of MeCP2 contributes to BDNF expression. *Epigenetics* 7, 695-700.
- 29) Chahrour M, Jung S Y, Shaw C, Zhou X, Wong S T, Qin J and Zoghbi H Y (2008) MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320, 1224-1229.
- 30) Harper A A and Lawson S N (1985) Conduction velocity is related to

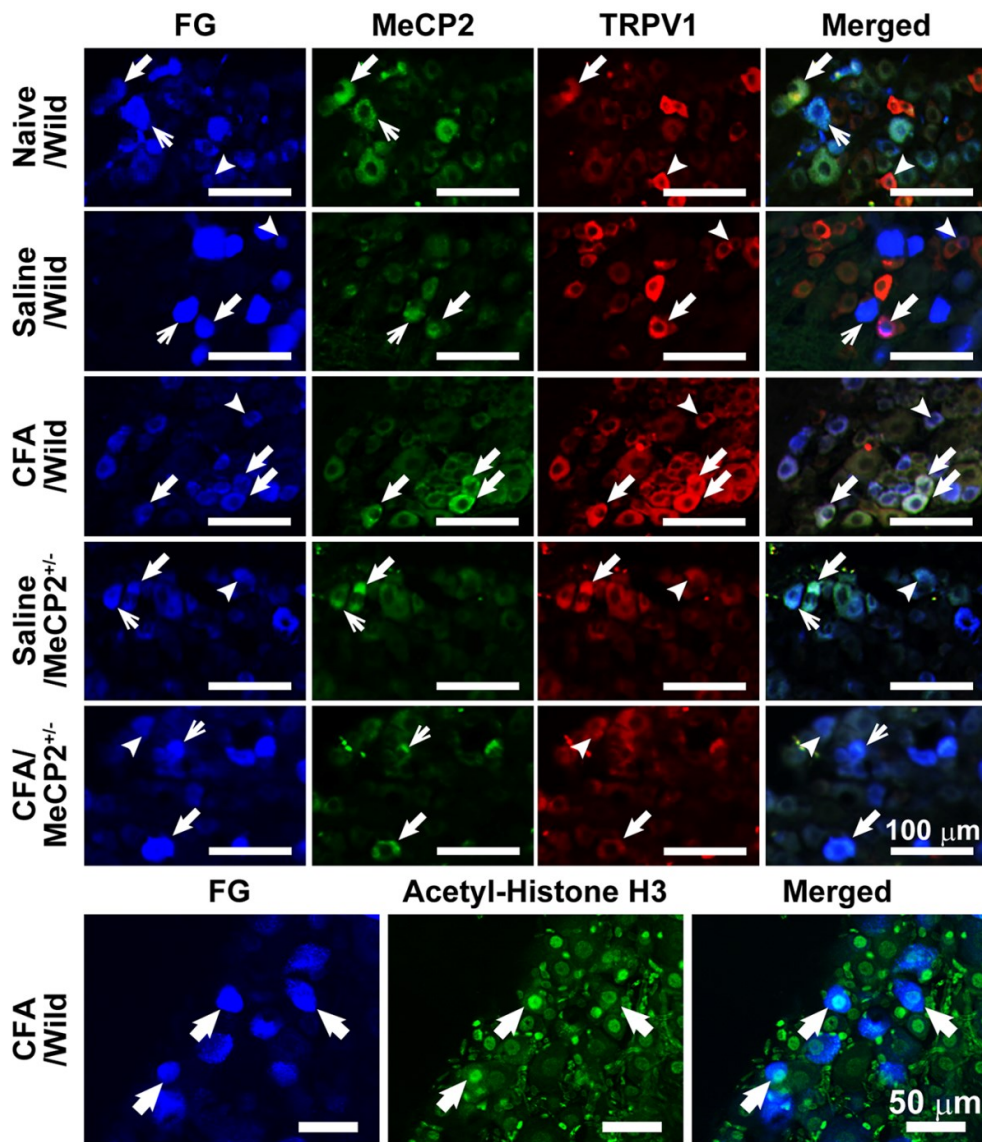
- morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 359, 31-46.
- 31) Cho H, Yang Y D, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back S K, Na H S, Harfe B D, Wang F, Raouf R, Wood J N and Oh U (2012) The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* 15, 1015-1021.
- 32) Julius D and Basbaum A I (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
- 33) Takayama Y, Uta D, Furue H and Tominaga M (2015) Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5213-5218.
- 34) Kanazawa T and Matsumoto S (2014) Expression of transient receptor potential vanilloid 1 and anoctamin 1 in rat trigeminal ganglion neurons innervating the tongue. *Brain Res Bull* 106, 17-20.
- 35) Lee B, Cho H, Jung J, Yang Y D, Yang D J and Oh U (2014) Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol Pain* 10, 5.
- 36) Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp S E, Stab J, Chen X,

- Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B and Voets T (2011) TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70, 482-494.
- 37) Manners M T, Tian Y, Zhou Z and Ajit S K (2015) MicroRNAs downregulated in neuropathic pain regulate MeCP2 and BDNF related to pain sensitivity. *FEBS Open Bio* 5, 733-740.
- 38) Huang J J, Shi Y Q, Li R L, Hu A, Lu Z Y, Weng L, Wang S Q, Han Y P, Zhang L, Li B, Hao C N and Duan J L (2015) Angiogenesis effect of therapeutic ultrasound on HUVECs through activation of the PI3K-Akt-eNOS signal pathway. *Am J Transl Res* 7, 1106-1115.



第1図 舌への熱刺激に対する HHWT の変化

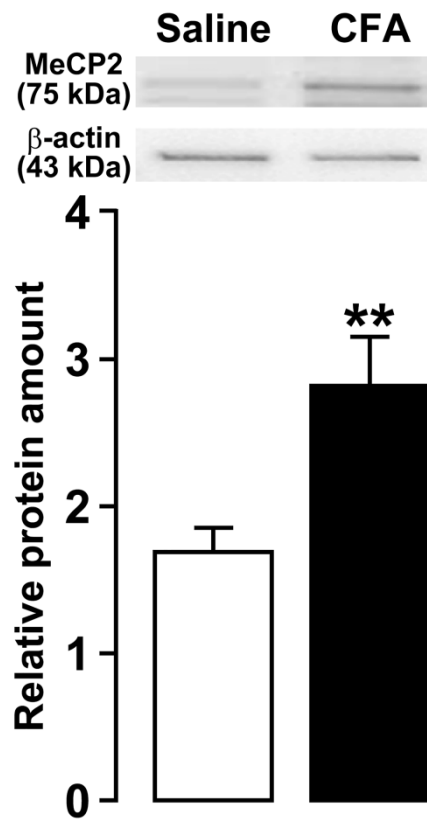
生理食塩水または CFA を wild および *Mecp2*^{+/-} マウスに注射後 HHWT を測定した (n=5)。データは平均±SEM で示した。統計分析: two-way ANOVA, *** : $P < 0.001$



第2図 MeCP2, TRPV1, Acetyl-Histone H3 の免疫組織化学染色

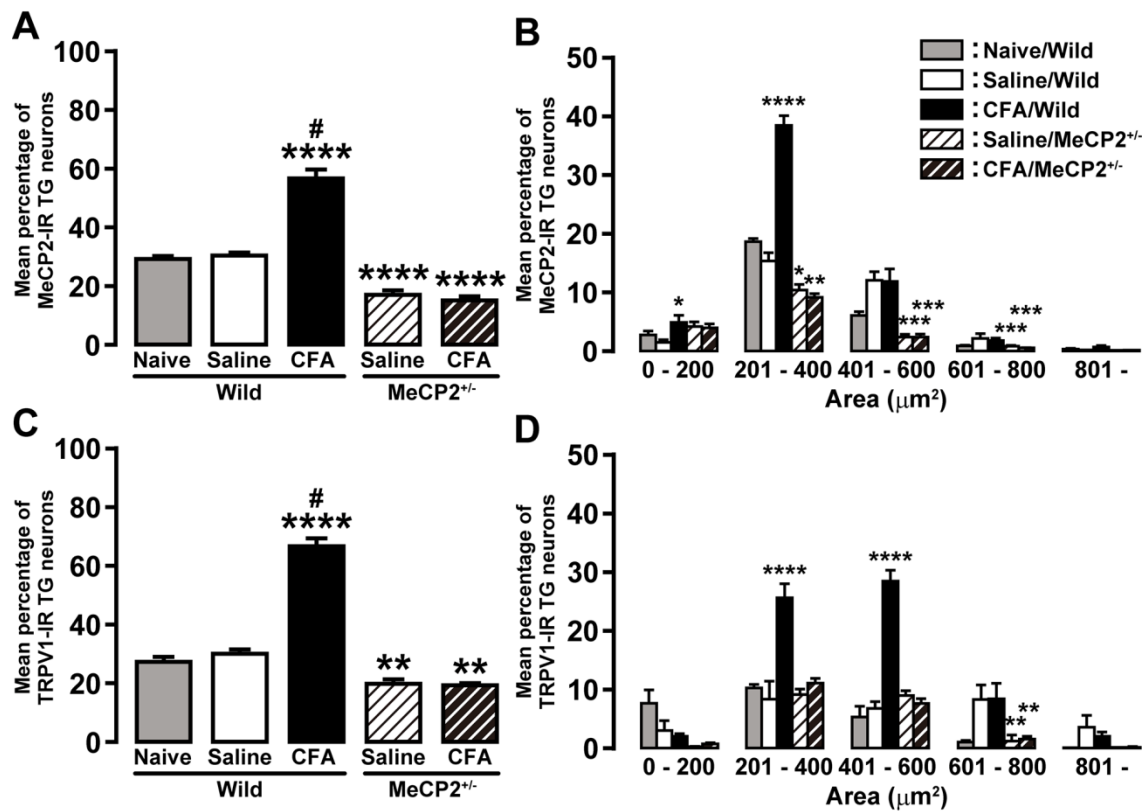
Wild および *MeCP2*^{+/-} マウスに生理食塩水または CFA を注射後 3 日目に FG でラベルされた MeCP2 および TRPV1 TG ニューロンの発現を示した。太い矢印は、FG でラベルされた MeCP2 および TRPV1 陽性 TG ニューロンを示した。細い矢印は、FG でラベルされた MeCP2 陽性 TG ニューロンを示した。矢頭印は、FG でラベルされた TRPV1 陽性 TG ニューロンを示した。

Wild マウスにおいて、CFA 注射後 3 日目における FG でラベルされた Acetyl-Histone H3 陽性 TG ニューロンを示した。矢印は Acetyl-Histone H3 陽性 TG ニューロンを示した。



第3図 TGにおけるMeCP2タンパクの半定量

Wild マウスに生理食塩水またはCFA注射後3日目に、TGにおけるMeCP2タンパクの半定量解析を行った。β-actinをコントロールとして定量化した (n = 8)。統計分析：Student's *t*-test, ** : $P < 0.01$ 。



第4図 MeCP2, TRPV1 の数の割合と細胞体面積

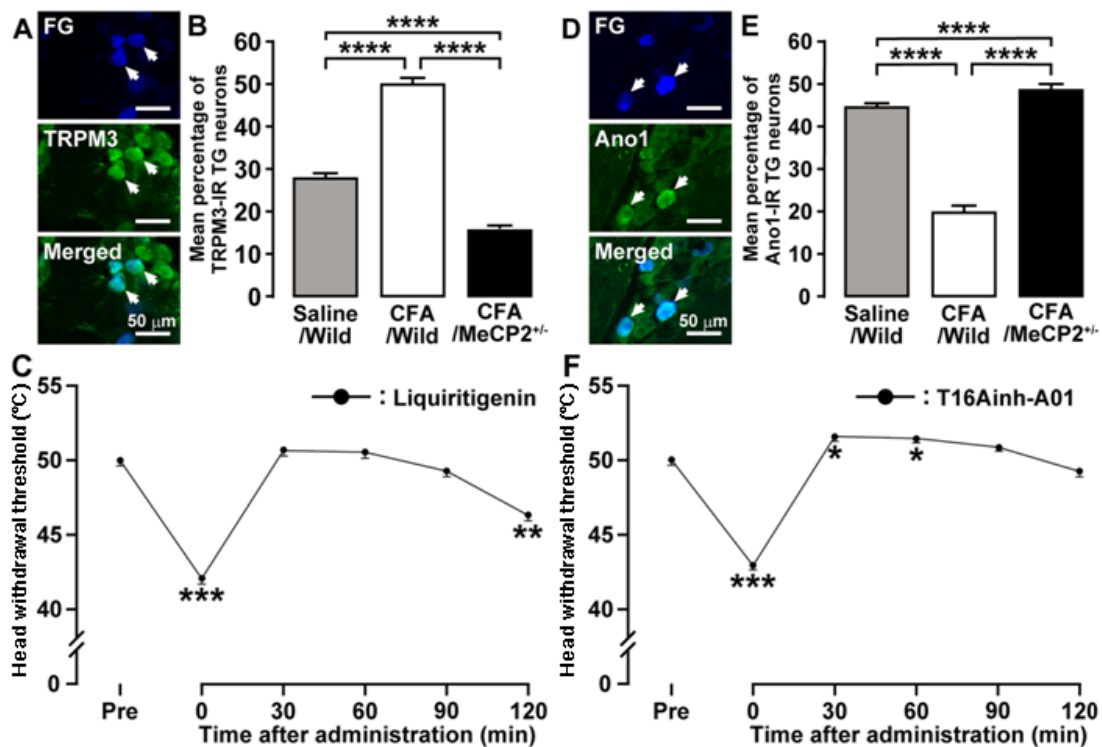
A および C : MeCP2 および TRPV1 陽性細胞数の割合

B および D : MeCP2 および TRPV1 陽性細胞体面積の分類 (n = 5)

統計分析 : One-way ANOVA 後, Bonferroni's multiple-comparison tests,

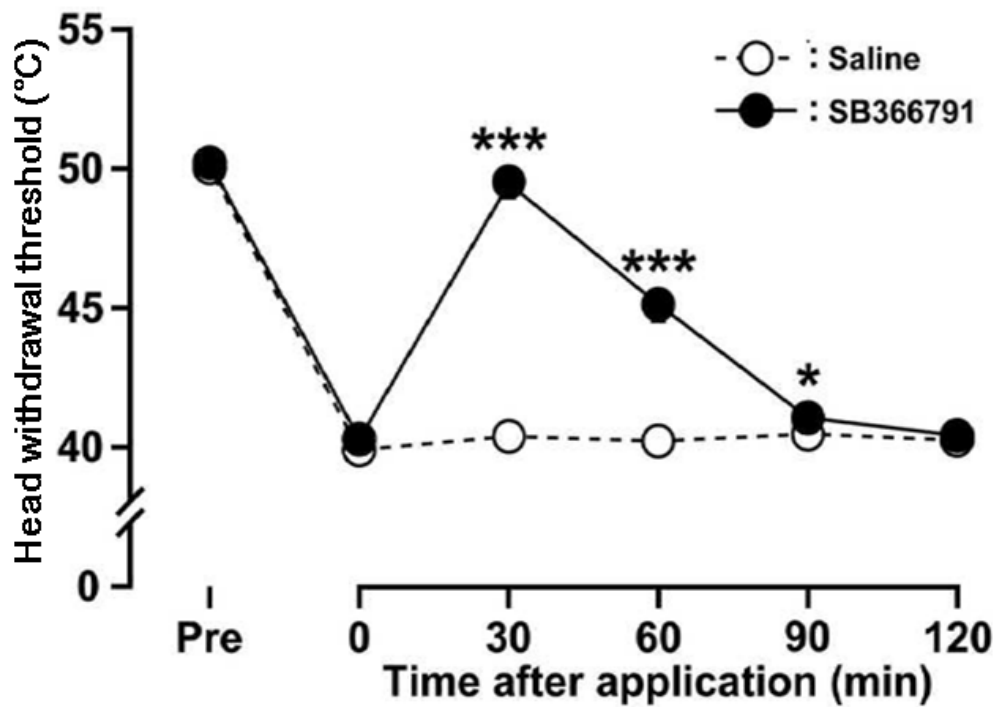
* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$ (vs. Saline/Wild)

: $P < 0.0001$ (vs. CFA/Mecp2^{+/-})



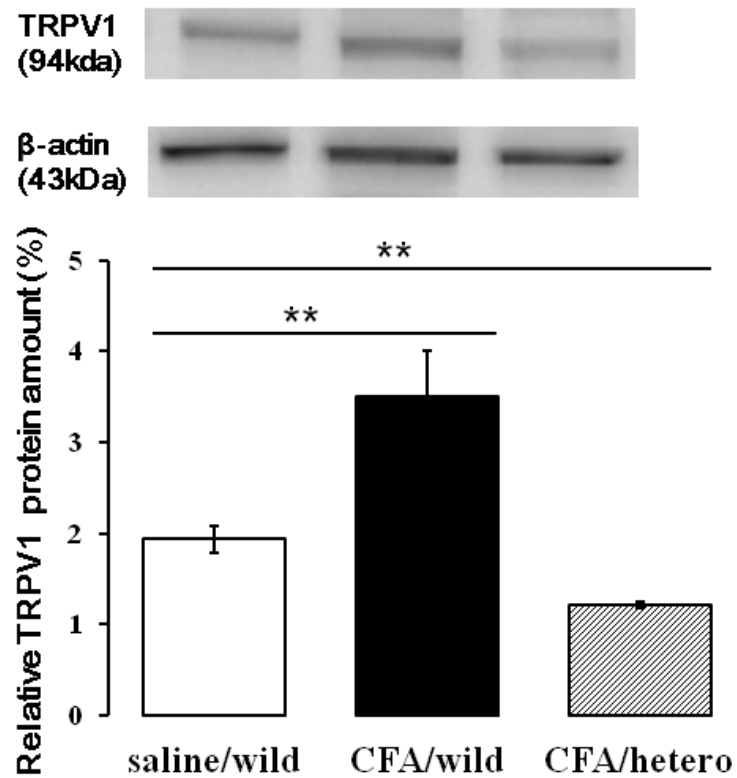
第5図 TRPM3, ANO1 阻害薬投与の効果

A: 矢印は wild マウスにおける CFA 注射 3 日後での FG でラベルされた TRPM3 陽性 TG ニューロンを示した。B: Wild または *MeCP2*^{+/-} マウスにおいて生理食塩水または CFA 注射 3 日後, FG でラベルされた TRPM3 陽性 TG ニューロンの割合を示した。データは平均±SEM で表した。統計分析: one-way ANOVA 後, Bonferroni's multiple-comparison tests, ****: $P < 0.0001$ ($n = 5$), C: Wild マウスにおける CFA 注射 3 日後での, liquiritigenin 投与前, 投与後 0, 30, 60, 90 および 120 分の HHWT を測定した。データは平均±SEM で表した。統計分析: one-way ANOVA 後, Bonferroni's multiple-comparison tests, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ ($n = 5$), D: 矢印は, wild マウスにおける CFA 注射 3 日後での FG でラベルされた ANO1 陽性 TG ニューロンを示した。E: Wild または *MeCP2*^{+/-} マウスにおいて生理食塩水または CFA 注射 3 日後に FG でラベルされた ANO1 陽性 TG ニューロンの割合を示した。データは平均±SEM で表した。統計分析: one-way ANOVA 後, Bonferroni's multiple-comparison tests, ****: $P < 0.0001$ ($n = 5$), F: Wild マウスにおける CFA 注射 3 日後, T16Ainh-A01 の投与前, 投与後 0, 30, 60, 90 および 120 分後の HHWT を測定した。データは平均±SEM で表した。統計分析: one-way ANOVA 後, Bonferroni's multiple-comparison tests, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ ($n = 5$).



第6図 TRPV1拮抗薬投与によるHHWTの変化

Wild マウスにおける CFA 注射 3 日後, SB366791 の投与前, 投与後 0, 30, 60, 90 および 120 分後に HHWT を測定した。データは平均±SEM で表した。統計分析: one-way ANOVA 後, Bonferroni's multiple-comparison tests, * : $P < 0.05$, *** : $P < 0.001$ (n = 5)。



第7図 舌における TRPV1 タンパクの半定量

Wild および *Mecp2*^{+/-}マウスに生理食塩水または CFA 注射後 3 日目に, 舌における TRPV1 タンパクの半定量解析を行った。β-actin をコントロールとして定量化した (n = 7)。統計分析: one-way ANOVA 後, Bonferroni's multiple-comparison tests, ** : P < 0.01。