

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22360

研究課題名(和文) ミオシンホスファターゼ阻害因子による新たな繁殖障害治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for reproductive disorders with myosin phosphatase inhibitory factor

研究代表者

堀 正敏 (Hori, Masatoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：70211547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、平滑筋に特異的に発現しているミオシンホスファターゼ阻害タンパク質 CPI-17に着目し、雌における妊娠から分娩、雄における精子数やその活性にCPI-17の役割を明らかにするために、CPI-17欠損マウスとリン酸化抵抗性CPI-17[T38A]ミュータントマウスを用いて解析した。CPI-17は雄の精子活性には影響しなかった。子宮平滑筋のオキシトシン収縮と正常な妊娠期間を保持するのにCPI-17の機能が必要であることが判った。CPI-17は排卵数には影響しなかったが、CPI-17の欠損や機能異常は産仔数が増加した。今後さらにミオシンホスファターゼ経路の着床～分娩までの機能について解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CPI-17は1995年にブタの動脈よりクローニングされて以来、実に20年以上遺伝子改変動物の作出に成功していなかったが、2015年に申請者がゲノム編集によってCPI-KOとCPI-TAの二系統の遺伝子改変動物作出に成功した。すなわち、本研究申請により、個体の受精～着床～分娩に至る過程におけるCPI-17の生理的役割が解明できれば、さらに世界をリードする研究成果となり、繁殖生理学分野に新しい研究領域を展開することが可能である。CPI-17はヒトに至るまで種を超えて広く保存されていることがわかっている。従って、本研究で得られた成果を、ブタの繁殖障害研究への応用の足がかりとする。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the myosin phosphatase inhibitor protein CPI-17, which is specifically expressed in smooth muscle. The purpose of this study was to clarify the role of CPI-17 in pregnancy and delivery in females and sperm count and its activity in males. Analysis was performed using CPI-17-deficient mice and phosphorylation-resistant CPI-17 [T38A] mutant mice. CPI-17 did not affect male sperm activity. It was found that the function of CPI-17 is required to maintain oxytocin contraction of uterine smooth muscle and normal gestation period. CPI-17 did not affect the number of ovulations, but CPI-17 deficiency and dysfunction increased the number of offspring. In the future, we will further analyze the function of the myosin phosphatase pathway from implantation to delivery.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：子宮平滑筋 妊娠 分娩 CPI-17 排卵数

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋の収縮は、ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)とミオシン軽鎖ホスファターゼ(MLCP)の活性バランスにより、ミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化量が調節されることで制御される。平滑筋に収縮性の刺激が加わると、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度が上昇し、MLCKが活性化されることで、MLCのリン酸化レベルが上昇して平滑筋は収縮する。一方MLCPの活性を抑制することで、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度非依存的に収縮を制御する、Ca<sup>2+</sup>感受性増加機構と呼ばれる経路がある。PKC/CPI-17経路はこの機構の一つで、主に平滑筋に発現するCPI-17がMLCPの活性を阻害することでリン酸化ミオシン(p-MLC)を増加させ、平滑筋収縮を増強させる。CPI-17は妊娠末期の子宮平滑筋においてその発現が増加することが知られているほか、近年では周産期疾患の発生に関与しているという報告が複数されており、正常な妊娠の維持や分娩の進行に関与していることが考えられている。

### 2. 研究の目的

本研究では、野生型マウス(C57BL/6; WT) 当研究室にて作製したCPI-17を欠損させたマウス(以下CPI-17KO) およびCPI-17のリン酸化抵抗性[T38A]CPI-17 mutant ノックインマウス(以下CPI-17TA)を用いて、子宮平滑筋収縮および、生理状態での妊娠や分娩といった繁殖機能におけるCPI-17の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

CPI-17KO およびCPI-17TAはCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用い、野生型マウス(C57BL/6; WT)を背景として本学動物遺伝学教室と実験動物学教室の藤井と角田らの協力により作製された。発生や成長の過程において、CPI-17KOおよびCPI-17TAに目立った表現型は見られなかった。実験には8~11週齢の雌雄を用いた。

WT、CPI-17KO およびCPI-17TAの繁殖能力について検討するために、排卵数、産仔数および雄性マウスの精子活性を測定した。

非妊娠発情期および妊娠末期にある各マウスから子宮を摘出し、マグヌス法により収縮張力を等尺性に測定した。収縮刺激として高濃度K<sup>+</sup>(High-K<sup>+</sup>)、カルバコール(CCh; ムスカリン受容体作動薬) およびオキシトシン(Oxy; 子宮収縮ホルモン)を用いた。非妊娠発情期および妊娠末期にある各マウスから摘出した子宮の薄層切片を作製し、HE染色による組織学的な観察を行った。

### 4. 研究成果

各マウスの排卵数および精子活性については有意な差は認められなかった。産仔数はCPI-17KO およびCPI-17TAでWTよりも有意に多くなり、CPI-17KOとCPI-17TAでは有意な差は認められなかった。

各マウスの子宮平滑筋において、High-K<sup>+</sup>による最大収縮および持続的収縮の絶対張力に系統による有意な差は認められなかった。CCh誘発性の収縮張力についても、非妊娠発情期および妊娠末期の両方において、各マウスで有意な差は認められなかった。Oxy誘発性収縮における最大収縮の絶対張力には各マウスで有意な差は認められなかったが、相対張力を用いて持続的収縮力を定量したところ、非妊娠時においてCPI-17KOではWTよりも有意に低下していた。CPI-17TAにおいても同様の傾向が認められたが、有意ではなかった。

組織学的な観察において、非妊娠時には各マウスにおける子宮平滑筋層の厚さに有意な違いは認められなかったが、妊娠末期ではCPI-17KOおよびCPI-17TAではWTよりも有意に菲薄化した子宮平滑筋層が観察された。

本研究ではCPI-17KO およびCPI-17TAを用いて非妊娠時および妊娠末期におけるCPI-17の重要性について検討した。摘出した子宮平滑筋組織標本を用いた収縮実験の結果から、PKC/CPI-17

経路はオキシトシンを介した収縮経路に関与していること、また T38 のリン酸化が CPI-17 の活性において重要であることが示唆された。WT と比較して CPI-17K0 および CPI-17TA においては、排卵数には差がないにも関わらず有意に産仔数が増加することが認められたが、収縮実験の結果および子宮平滑筋層の厚さの変化と併せて考えると、子宮の拡張性の変化が子宮容量の増大をもたらし、これが産仔数の増加につながったことが考えられる。しかしその確認には、子宮容量の測定や胎仔の生存率の評価といったさらに詳細な検討が必要である。

以上を要するに、本研究により、CPI-17 のリン酸化は子宮平滑筋の収縮において一定に関与しており、生理状態での子宮平滑筋の性質変化および繁殖能力の変化を引き起こしていることが推測された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kimura H, Imura YK, Tomiyasu H, Mihara T, Kaji N, Ohno K, Unno T, Tanahashi Y, Jan TR, Tsubone H, Ozaki H and Hori M	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Neural anti-inflammatory action mediated through two types of acetylcholine receptors in small intestine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41698-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kishi K, Kaji N, Endo M, Tsuru Y, Oikawa T, Hori M.	4. 巻 68(3)
2. 論文標題 Development of a quantitative method for evaluating small intestinal motility using ultrasonography in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Anim.	6. 最初と最後の頁 381-389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41698-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kishi K, Kaji N, Kurosawa T, Aikiyo S, Hori M	4. 巻 14(10)
2. 論文標題 Hyperglycemia in early stage of type 1 diabetes accelerates gastric emptying through increased networks of interstitial cells of Cajal.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/exanim.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura K, Kusama K, Ideta A, Kimura K, Hori M, Imakawa K.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Effects of miR-98 in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune regulation during the peri-implantation period in cattle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 20330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56879-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 1. Yang Q, Hori M	4. 巻 11(7)
2. 論文標題 Characterization of contractile machinery of vascular smooth muscles in hypertension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.791565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柴崎衣音、楊群輝、堀正敏
2. 発表標題 異なる妊娠ステージにおける子宮平滑筋の運動に対するCPI-17の機能解析
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴崎衣音、楊群輝、堀正敏
2. 発表標題 妊娠ステージによる子宮平滑筋収縮におけるCPI-17の役割
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Qunhui Yang, Ayaka Maki, Noriyuki Kaji, Hiroshi Ozaki, Masatoshi Hori
2. 発表標題 Delayed colonic motility in functionally deficient mice of myosin phosphatase inhibitory protein, CPI-17.
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楊群輝、梶典幸、堀正敏
2. 発表標題 CPI-17遺伝子改変マウスにおける頸動脈結紮による血管リモデリングの影響
3. 学会等名 第61回 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医薬理学研究室  
<https://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/yakuri/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水野 理介  (Mizuno Risuke)  (30273080)	岡山理科大学・獣医学部・教授    (35302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------