

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03125

研究課題名(和文) ミオシン・ホスファターゼレギュレーターを介した管腔臓器機能制御

研究課題名(英文) Functional control of Luminal organ via myosin phosphatase regulator.

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：内臓管腔臓器の収縮弛緩を制御する一つの経路としてミオシンホスファターゼ(MPPase)の阻害因子CPI-17のThr38のリン酸化によるMPPase阻害経路がある。本研究では、CPI-17のノックアウトマウス(KO)、非リン酸化模倣型の[Thr38Ser]CPI-17ノックインマウス(TS)を使って、正常血圧や正常消化管運動、さらに高血圧でのCPI-17の重要性を検証した。結果、正常血圧維持や食塩負荷高血圧発症にCPI-17は重要な役割を担うことが明らかになった。一方、正常な胃腸の輸送能維持にCPI-17は大きな役割を担わない、あるいは他の経路が代替する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CPI-17は多くの内臓臓器の運動を制御する平滑筋細胞特異的に発現するミオシンホスファターゼ(MPPase)の内因性阻害タンパク質であり、高血圧や、下痢や便秘、分娩異常、気管支喘息、失禁や頻尿など多くの疾患とも関連性がある。したがって、本研究で得られたCPI-17のin vivoでの生理・病態生理学的機能の解明は極めて学術的に高い研究であり、人や動物の健康維持にとっても極めて社会的意義の大きい基礎研究として位置づけられる。今後、さらに本テーマに関連する基盤研究の継続が、疾患治療薬の開発や臓器の老化研究の基盤構築にも繋がることが予測され、学術的にも社会的にも意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：One pathway that regulates contraction-relaxation of visceral luminal organs is the myosin phosphatase (MPPase) inhibitory pathway through phosphorylation of Thr38 of CPI-17 via PKC, an inhibitor of MPPase. In this study, we used CPI-17 knockout (KO) and non-phosphorylation mimetic [Thr38Ser]CPI-17 knock-in (TS) mice to examine the importance of CPI-17 in normal blood pressure and normal gastrointestinal motility, as well as in hypertension. The results revealed that CPI-17 plays an important role in the maintenance of normal blood pressure and the development of salt-loaded hypertension. On the other hand, it was suggested that CPI-17 does not play a major role in the maintenance of normal gastrointestinal transport capacity, or that other pathways may substitute for it in KO and TA mice.

研究分野：薬理学

キーワード：平滑筋 血管 消化管 フォスファターゼ ミオシン CPI-17 血圧 蠕動

1. 研究開始当初の背景

① ミオシンのリン酸化制御 平滑筋や非筋細胞の細胞運動(遊走)はミオシンのリン酸化により制御される。ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)は細胞内 Ca^{2+} により活性化されミオシンをリン酸化し、アクチンとの相互作用を発揮し細胞は収縮する。細胞内 Ca^{2+} が減少するとミオシンホスファターゼ(MPPase; PP1c・MYPT1・20kDの3量体から構成)の活性がMLCKの活性を上回り、ミオシンは脱リン酸化される。すなわち、MPPaseの活性は常に一定であり、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化だけが細胞運動や遊走を制御すると考えられてきた(ミオシンのリン酸化説)。しかし、近年になり次に示すMPPaseによる制御機構の存在が明らかになり、管腔臓器の運動や様々な免疫・炎症応答の研究基盤を構築し直す必要性が出て来た。

② ホスファターゼ・レギュレーション経路 平滑筋細胞や筋線維芽細胞において、CPI-17はPKCなどにより38番目のスレオニン残基(T38)がリン酸化され、PP1cと結合し直接MPPaseの活性を阻害する(CPI-17/PP1c経路)。実は両細胞にはもう一つのMPPase阻害経路がある。Rho-A-GTPによって活性化されるRho-kinase(ROCK)によるMYPT1のリン酸化(T696とT853)を介した阻害経路である(ROCK/MYPT1経路)。これまでの研究から、両経路は平滑筋細胞のMPPase活性を阻害し、相対的にMLCK活性を上昇させ細胞運動や収縮を増強させることがin vitroの系で証明された。すなわち、細胞内 Ca^{2+} 濃度が一定であってもMPPaseの活性阻害により細胞運動が増強されることから、細胞運動の『 Ca^{2+} 感受性増加機構』と呼ばれる。 Ca^{2+} 感受性増加機構は、血管においては高血圧や脳血管攣縮などの病態に関与すると考えられ、近年これら二つの経路に関する研究が世界で盛んに行われ現在に至っている。

③ ホスファターゼ・レギュレーション経路による多彩な生理・病態機能制御の可能性

元来、CPI-17は平滑筋細胞に特異的に発現していると考えられていた。しかし、様々な炎症性疾患において線維芽細胞や他の間質構成細胞はしばしば筋線維芽細胞に形質を変え炎症や線維化に関与する。この筋線維芽細胞は α SMアクチンを発現するだけでなく、CPI-17をも発現することから、病態時での細胞遊走にCPI-17が深く関与する可能性がある。さらに、CPI-17は血管内皮細胞にも発現し内皮細胞の物質透過性制御に関与する可能性(Cardiovascular Res 2010, PLoS One 2016)や、がん細胞に発現しがん抑制タンパク質であるMerlinのリン酸化制御に関与する可能性(Nature 2006, Lung cancer 2009, Oncotarget 2016)、さらには小脳プルキンエ細胞に発現し位置情報・記憶形成に関わる可能性(Neuron 2002)など、多彩な生理・病態生理学的機能を担う可能性が示されてきた。しかし、CPI-17が同定されて以来この20年間、世界中の研究者がCPI-17のKOマウス作出を試みたが成功に至らず、これらの知見はいずれもin vitro、あるいはex vivoでの断片的な知見に留まっている。一方、MYPT1も平滑筋細胞特異的に発現していると考えられてきたが、近年小腸上皮細胞や血管内皮細胞など他の非筋細胞での発現も多数報告され(Gene 2016, Sci Rep 2017)、CPI-17/PP1c経路とROCK/MYPT1経路は多くの細胞で存在するMPPase制御経路であると認識されるようになってきた。すなわち『平滑筋細胞を中心に複数の細胞種に認められるCPI-17/PP1cとROCK/MYPT1という二つのホスファターゼ・レギュレーション経路が、細胞運動・遊走・透過性機能に加えて様々な未知の機能を制御し、生体内で実際にどのような生理・病態生理学的機能にどの程度関与するのか、両経路の本質的な役割の解明が今まさに問われている。』

2. 研究の目的

本研究では、野生型マウス(WT)に加えて、先に挑戦的萌芽研究で作製に成功したCPI-17の欠損マウス(KO)と、CPI-17のリン酸化部位にアミノ酸変異を加え、恒常的に非リン酸化状態を模倣する[Thr38Ala]CPI-17ノックインマウス(TA)を用いる。さらに、細胞系を用いてCPI-17のリン酸化が蓄積する恒常的リン酸化を模倣するのックインマウスを開発する。CPI-17遺伝子改変マウスを用いて、各種管腔臓器(本申請では血管、消化管)に着目し、それらの生理機能や両臓器で発症する疾患での病態において、CPI-17/PP1c経路がどのように関与するのかをin vitroからin vivoレベルで解明する。

3. 研究の方法

①細胞系を用いたリン酸化模倣型CPI-17ノックインHEK293細胞に各種点変異を起こしたCPI-17[T38X](X:各種置換アミノ酸)をFlp-InT-Rex哺乳類タンパク質誘導性発現システムを使って安定的に発現させ、Phos-tag PAGE法にてCPI-17のリン酸化量を測定し、恒常的にホスファターゼ活性を阻害して細胞内でタンパク質リン酸化反応を亢進させるCPI-17変異体を同定する。また、同変異体をゲノム編集技術を使ってノックインマウスを作製する。

②マウス大動脈、マウス小腸ならびに大腸輪走筋標本作製し、高濃度 K^+ 刺激や受容体作動薬刺激による等尺性収縮を測定した。

③マウスに ^{13}C オクタン酸を捕食させた後経時的に呼気を採取し、呼気中の ^{13}C 含量を測定する

ことで（呼吸試験法）胃排泄能を測定した。また、FITC 蛍光色素を含む生理食塩水を強制経口投与し 1 時間後の蛍光色素の消化管内での分布を測定することで小腸輸送能を測定した。ガス麻酔科で直径 1.5 mm のガラスビーズを肛門から大腸に 3 cm 挿入し、マウスが覚醒してからガラスビーズが排泄されるまでの時間を大腸輸送能として計測した。

④8%NaCl 食塩水+Deoxycorticosterone acetate (DOCA)負荷による高食塩負荷高血圧モデルマウスを WT、KO、TA でそれぞれ作製し、テレメトリーシステムを用いて経時的に 7 週間まで血圧を計測した。また、無麻酔無拘束下での尾動脈圧測定による非観血的血圧測定法も利用して血圧の変動について記録した。

4. 研究成果

①各種置換アミノ酸)を Flp-InT-Rex 哺乳類タンパク質誘導性発現システムを使って安定的に発現させ、Phos-tag PAGE 法にて CPI-17 のリン酸化量を測定した。結果、Thr を Ser に置換した [Thr38S]CPI-17 を強制発現させた HEK 細胞において、リン酸化蓄積型のフェノタイプを示した。そこで、ゲノム編集技術を利用し、[Thr38S]CPI-17 ノックインマウスを作出した（以下、TS）。その後、TS を用いて大動脈平滑筋ならびに消化管平滑筋の受容体刺激による収縮性について検証したが、得られた結果にばらつきが大きく、受容体刺激の収縮性が WT と TS の間で有意な変化があるか否か明確に確定するに至らなかった。従って、これらの標本を生化学用に固定したサンプルを作製し、今後ミオシンのリン酸化量を測定することで、TS の表現型が CPI-17 のリン酸化蓄積型であるか否かさらに解析する。

②大動脈平滑筋のホルボールエステル (PDBu) やノルアドレナリンの収縮性は WT に比べて KO と TA では有意に減弱していた。消化管平滑筋（回腸輪走筋、結腸輪走筋）において、カルバコールの収縮性は WT に比べて KO と TA で有意に減弱していた。また、大動脈平滑筋、大動脈平滑筋ともに高度喉 K⁺による収縮性に WT、KO、TA 間で差は認められなかった。

③¹³C オクタン酸を用いた胃排泄能や FITC 含有生理食塩水を用いた小腸輸送能、ならびにビーズを用いた大腸輸送能は、WT、KO、TA の間で有意な差はなかった。

④正常個体において、WT に比べて KO と TA ではおよそ 10 mmHg 有意に静止血圧が低下していた。WT の食塩負荷高血圧モデルマウスにおいて、血圧は 105 mmHg 前後の正常血圧から経時的に随時上昇し高、食塩食負荷後およそ 6 週から 7 週間後に最大に達しおよそ 135 mmHg の高血圧を示した。これに対して、KO ならびに TA において正常血圧は最大 95 mmHg であり、高食塩食負荷後の血圧上昇は顕著に抑制され 7 週間後においてもおよそ 110 mmHg であった。

以上の成績から、

1) CPI-17 のリン酸化蓄積を模倣するミュータントとして [Thr38Ser]CPI-17 が候補として挙げることはできたが、そのノックインマウス TS において、表現型が CPI-17 のリン酸化蓄積を模倣するか否か研究機期間内に明らかにすることができなかった。今後、ミオシンのリン酸化量の変化や CPI-17 のリン酸化量の変化を大動脈標本や消化管輪走平滑筋標本を用いて測定することで最終的な TS の表現型について明確にしていきたい。

2) 消化管平滑筋の受容体刺激による収縮には PKC/CPI-17 経路が関与することが示されたが、*in vivo* での消化管輸送能において、正常状態では CPI-17/PKC/PP1c 経路が生理的な役割を担っているかは検証することができなかった。

3) 正常血圧に CPI-17/PKC 経路が関与することが明らかにされた。さらに、高食塩負荷高血圧モデルにおいても、CPI-17/PKC/PP1c 経路が血圧上昇に関与する可能性が示唆された。これまでに ROCK/MYPT1 経路が重要であることが報告されていることから、今回得られた CPI-17/PKC/PP1c 経路の関与は高食塩負荷高血圧の病態解明や治療標的として重要な知見と考えられた。

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 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 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 -
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) 10.1538/expanim.	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 -
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) 10.1371/journal.pone.0222961. eCollection 2019.	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 -

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 -

〔学会発表〕 計7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 Taiki Mihara, Noriyuki Kaji, Masatoshi Hori
2. 発表標題 Carbon tetrachloride mediated liver fibrosis is alleviated in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor knockout mice.
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

1. 発表者名 鈴木智貴、田島剛、梶典幸、金田剛治、堀正敏
2. 発表標題 腸管平滑筋のアゴニスト誘発性収縮におけるミオシンホスファターゼ抑制経路の関与
3. 学会等名 第61回 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸和寿、梶典幸、黒澤珠希、愛清哲、堀正敏
2. 発表標題 糖尿病初期の持続的高血糖はカハール介在細胞のネットワーク増生を介して胃排泄運動を亢進させる
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
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.vn.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	江藤 真澄 (Eto Masumi) (20232960)	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
---------	---------