

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15678

研究課題名（和文）ミオシンホスファターゼを介した新規高血圧発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel hypertension mechanism mediated by myosin phosphate

研究代表者

楊 群輝（Yang, Qunhui）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：10866924

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、正常血圧維持に必須のタンパク質CPI-17は病態生理機能を着目し、CPI-17の遺伝子改変マウスを用いて、デオキシコルチコステロン酢酸-食塩（DOCA-食塩）誘発高血圧におけるCPI-17の機能を解析した。CPI-17欠損マウスや[T38A]CPI-17ノックインマウスでは有意にDOCAモデルによる高血圧が軽減したことから、CPI-17のThr38のリン酸化シグナルが食塩負荷高血圧発症に重要な役割を担うことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食塩誘発性的高血圧は日本では古くから臨床問題となっている。近年、RhoA/Rhoキナーゼ/MYPT1リン酸化経路がこの高血圧発症に重要な役割を担うことが明らかにされたが、Rho/Rhoキナーゼと並んで、ミオシンホスファターゼを阻害するPKCあるいはRhoA/RhoキナーゼCPI-17経路の関与は不明であった。本研究により新たにCPI-17経路も食塩誘発高血圧発症に関与する可能性が示されたことは、臨床医学上きわめて重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the pathophysiological function of CPI-17, a protein essential for maintaining normal blood pressure, and analyzed the function of CPI-17 in deoxycorticosterone acetate-salt (DOCA-salt)-induced hypertension using CPI-17 gene-modified mice. mice and [T38A]CPI-17 knock-in mice significantly reduced DOCA model-induced hypertension, indicating that the phosphorylation signal of Thr38 in CPI-17 plays an important role in the development of salt-loaded hypertension. These findings lead to the discovery of new therapeutic targets and are extremely important in clinical medicine.

研究分野：獣医薬理

キーワード：高血圧 CPI-17 DOCA-食塩

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食塩誘発性の高血圧は日本では古くから臨床上問題となっている。高血圧は脳血管疾患や虚血性心疾患の原因となり、特に高齢者や肥満、慢性腎疾患患者において疾病負荷を上昇させる。CPI-17 は主に PKC によって 38 位の Thr がリン酸化されることで活性化され、正常血圧の維持に必須のタンパク質であることを申請者はこれまでの研究成果により明らかにした。しかし、CPI-17 の食塩誘発性高血圧症における病態生理機能については全く不明である。一方、RhoA/Rho キナーゼ/MYPT1 リン酸化を介した経路が食塩負荷高血圧症に重要な役割を担うことが近年報告された。CPI-17 は PKC のリン酸化基質となるだけでなく RhoA/Rho キナーゼによるリン酸化の基質になることが生化学的に知られている。

2. 研究の目的

世界で初めて樹立に成功した 3 種の内因性の平滑筋ミオシンホスファターゼ阻害タンパク質である CPI-17 の遺伝子改変マウスを用いて、デオキシコルチコステロン酢酸 - 食塩 (DOCA) 誘発高血圧モデル (DOCA モデル) における CPI-17 の病態生理機能を解明し、動脈性高血圧症の新たな治療戦略の基盤を構築する。用いた改変動物は以下の通りである。

3. 研究の方法

(1) C57BL6J 野生型マウス (WT)、CPI-17 の KO マウス (KO)、CPI-17 の活性制御リン酸化部分 Thr38 を Ala に置換することで非リン酸化を模倣する [T38A] CPI-17 ノックインマウス (TA)、さらには、Thr38 を Ser に置換したフェノタイプは良く分かっていない [T38S] CPI-17 ノックインマウス (TS) を用いて、DOCA シリコンペレット (50 mg) をマウス背部皮下に埋め込み、1% 生理塩水を自由飲水させることで DOCA-食塩負荷モデルを作製し、食塩負荷開始から最大 45 日までマウスの血圧をテールカフ法ならびにテレメトリー法にて経時的に測定・解析した。

(2) 各種 CPI-17 遺伝子欠損マウスにおける DOCA モデルを作製し、大動脈、腎臓動脈を摘出し、フェニレフリンによる血管収縮性の変化について解析した。

(3) ELISA を用いて血清からのアルドステロン、アンジオテンシン II、レニンの産生量の定量解析を行った。

(4) ヘマトキシリン-エオシン染色 (HE) を施し、大動脈薄層切片を製作し、壁の厚さの定量解析を行った。免疫組織化学染色、腎臓の炎症を解析した。

4. 研究成果

生理、高血圧の状態いずれにおいても、マウスの胸部大動脈、腎動脈壁の厚さ、血管内皮の形態、平滑筋層、血管直径の各形態学的パラメーターは WT と CPI-17 遺伝子変異マウス間で有意な差は認められなかった。WT の DOCA モデルにおいて血清レニン、アルドステロン、ア

ンギオテンシン II の有意な減少が確認された。各遺伝子マウス群と WT 群でこれらの数値に有意差は認められなかった。WT の DOCA モデルでは有意な血圧上昇が認められ、TS では更なる血圧上昇が、KO と TA では有意な血圧減少が認められた。一日飲水量と一日排尿量も血圧変動に沿って増減した。WT と T38S は左右の腎臓重量が DOCA モデルで有意に増加したが、KO と T38A では DOCA モデルでの増加は認められなかった。なお、全ての DOCA モデルで腎臓の炎症像は認められなかった。DOCA モデルと正常動物において大動脈と腎動脈を摘出して *in vitro* での血管収縮性とその時のミオシンのリン酸化量、CPI-17 のリン酸化量の測定を行ったが、例数不足と技術の不安定さにより定量的な結果を得ることが出来なかった。今後さらに検証を進める予定である。

まとめ

本研究では、食塩感受性高血圧症発症における CPI-17 の重要性を明らかにするために、DOCA-食塩負荷高血圧モデル成功作りました。WT の DOCA モデルでは有意な血圧上昇が DOCA 高食塩負荷後 4 週に渡って維持され、TS において更なる血圧上昇が認められた。一方、KO と TA では WT に比べて有意に DOCA モデルでの血圧上昇は減弱していた。これらの結果から、PKC/CPI - 17 経路はミオシンホスファターゼ活性 (PP1PPase) を抑制して、CPI-17 のリン酸化が高血圧症における病態関係が重要であることが示された。しかし、その詳細な分子機構については更なる検証が必要である。また、TS の表現型についてもミオシンのリン酸化量や CPI-17 のリン酸化量の実測による検証を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Qunhui Yang, Masatoshi Hori	4. 巻 -
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 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life11070702	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 Chizuru Sogawa-Fujiwara, Yasuhiro Fujiwara, Atsuki Hanagata, Qunhui Yang, Taiki Mihara, Noriyuki Kaji, Tetsuo Kunieda, and Masatoshi Hori	4. 巻 -
2. 論文標題 Npr2 mutant mice show vasodilation and undeveloped adipocytes in mesentery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Res Notes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-021-05853-9	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------