

アクチン結合タンパク質drebrinの線維化に与える影響の解析

廣中, 貴則

<https://hdl.handle.net/2324/6787547>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

アクチン結合タンパク質 drebrin の
線維化に与える影響の解析

令和2年度入学

九州大学大学院 薬学府 創薬科学専攻

疾患制御学分野

廣中 貴則

目次

略語一覽	3
序論	5
方法	10
結果	31
考察	84
参考文献	88
謝辞	94

略語一覽

α -SMA: alpha-smooth muscle actin

BSA: Bovine serum albumin

BLM: bleomycin

CCl₄: carbon tetrachloride

CDAHFD: choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet

Cthrc1: collagen triple helix repeat containing 1

DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

drebrin: developmentally regulated brain protein

ECM: extracellular matrix

FBS: fetal bovine serum

GPCR: G protein-coupled receptor

ICM: ischemic cardiomyopathy

IPF: idiopathic pulmonary fibrosis

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LIMK: Lin11, Isl-1 and Mec-3 kinase

MACS: magnetic-associated cell sorting

MI: myocardial infarction

MRTF: myocardin-related transcription factor

NASH: nonalcoholic steatohepatitis

NF: non-failing

PSD-95: postsynaptic density protein 95

qRT-PCR: quantitative real time polymerase chain reaction

ROCK: Rho-associated protein kinase

SDS: Sodium dodecyl sulfate

siRNA: small interfering ribonucleic acid

SOX9: SRY-Box Transcription Factor 9

SRF: serum response factor

TAA: thioacetamide

TGF- β : transforming growth factor- β

序論

線維化は、組織に炎症を起点としてコラーゲン等の細胞外マトリックス(ECM: extracellular matrix)が過剰に蓄積した状態である(1-3)(Figure I)。線維化した組織は、硬くなり可塑性を失い、最終的には機能不全へと陥る。例えば、心筋梗塞(MI: myocardial infarction)により線維化した心臓は心不全へと繋がり(4, 5)、特発性肺線維症(IPF: idiopathic pulmonary fibrosis)により線維化した肺は重篤な呼吸器障害へと繋がり(6)、非アルコール性脂肪肝炎(NASH: nonalcoholic steatohepatitis)により線維化した肝臓は肝硬変、肝がんへと繋がる(7, 8)。これらのように、線維化は多くの死因と密接に関与し、その割合は先進国の全死亡原因の約 45%に値することが報告されている(9, 10)。しかしながら、現在線維化を改善する有効な治療薬は存在せず、その早期開発が望まれている(11)。

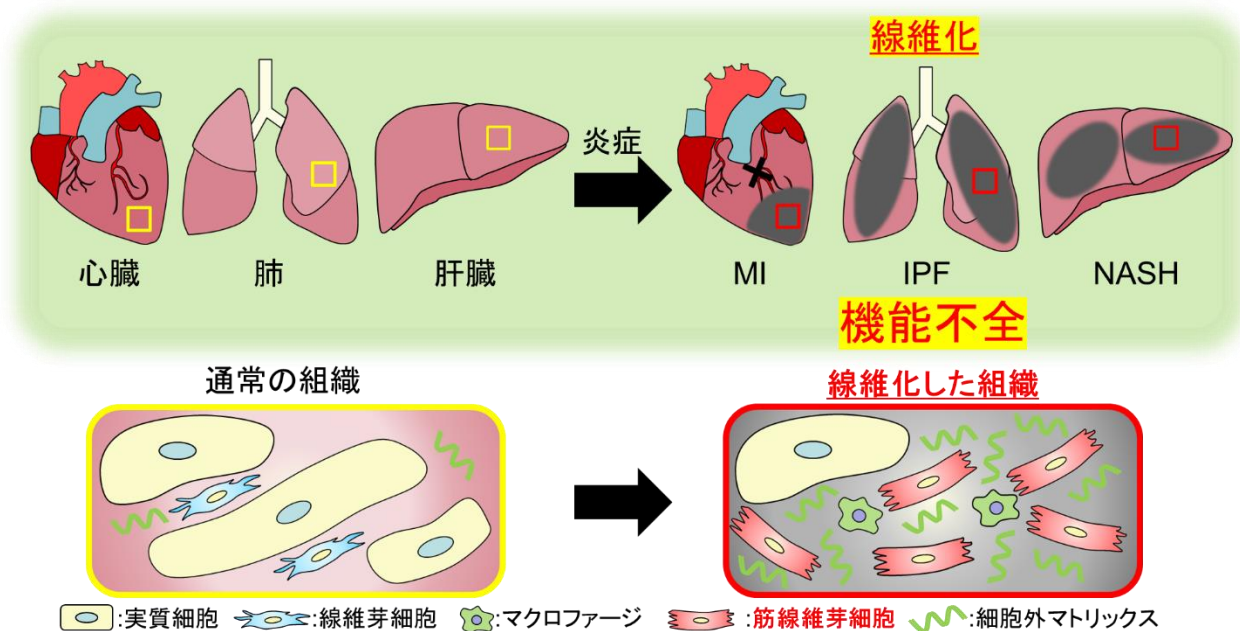


Figure I. 線維化の概要図

過剰な細胞外マトリックスの産生を介して、線維化を実行する細胞は筋線維芽細胞として知られている(12, 13)。筋線維芽細胞は通常時には存在せず、組織障害時に常在性の線維芽細胞をはじめとする様々な細胞から分化することで生じる(Figure II)。この筋線維芽細胞への分化をもたらす刺激として、最も知られているのは、炎症時に放出される transforming growth factor- β (TGF- β)である(14)。TGF- β は血球系細胞から主に放出され、コラーゲンや alpha-smooth muscle actin (α -SMA)などの筋線維芽細胞のマーカー分子の発現を促進する。

筋線維芽細胞の大きな特徴の一つとして、高い細胞外マトリックス産生能に加えて、アクチンタンパク質 α -SMA などにより形成される発達したアクチン骨格が挙げられる(15)。この発達したアクチン骨格は、筋線維芽細胞の分化状態の維持や細胞外マトリックス産生に大きく寄与することが知られている。しかしながら、これまで筋線維芽細胞のアクチン骨格形成メカニズムには、不明な点が多く存在した。

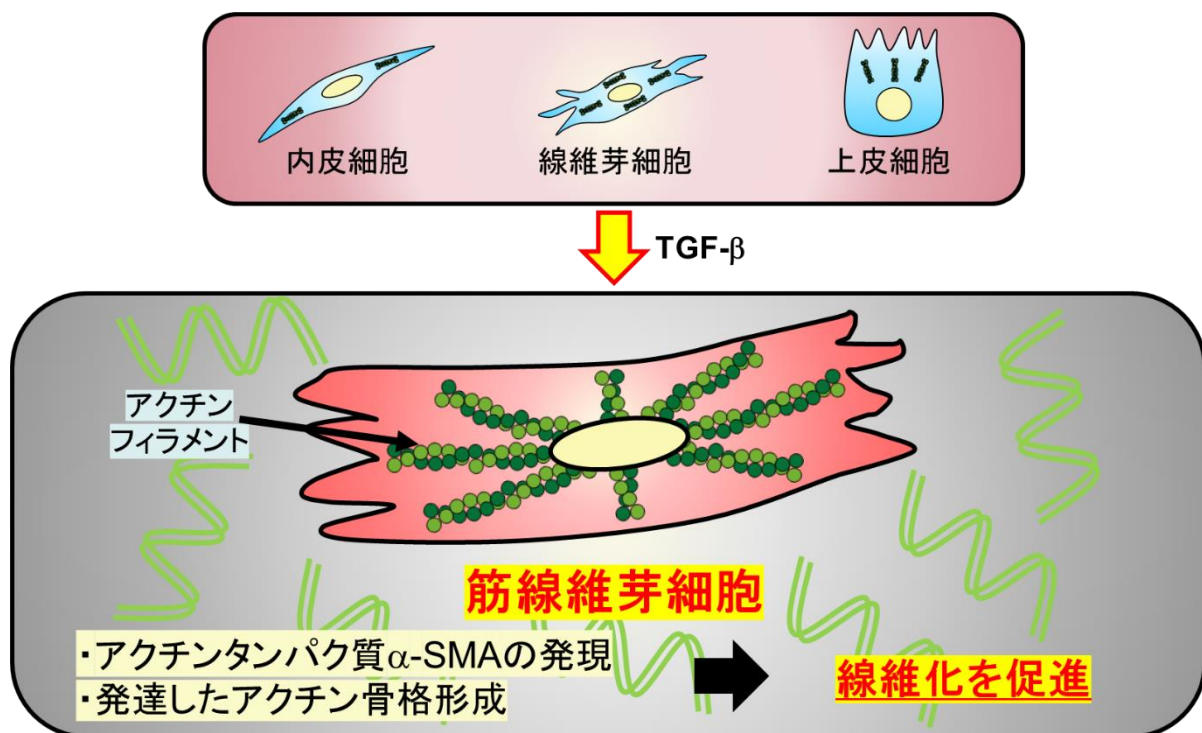


Figure II. 筋線維芽細胞におけるアクチン骨格

筋線維芽細胞のアクチン骨格形成を担う主要なシグナルの 1 つとして知られるのが、myocardin-related transcription factor (MRTF)- Serum response factor (SRF)シグナルである。その転写共役因子 MRTF は、通常時には G-アクチンと結合し、細胞質に局在しているが、細胞外マトリックス刺激によるインテグリンの活性化などを介して、G-アクチンが F-アクチンへと重合すると、G-アクチンから解離し、核内へと移行する(16)(Figure III)。核内に移行した MRTF は転写因子 SRF と結合し、アクチンタンパク質 α -SMA(*Acta2*)や細胞外マトリックス(ECM)の産生を促進する(17)。このようにして産生された細胞外マトリックスは、インテグリンなどの受容体を介して、物理的刺激を筋線維芽細胞に伝え、また、 α -SMA はこの物理的なシグナル伝達を増強する。すなわち、 α -SMA(*Acta2*)や細胞外マトリックス(ECM)は、この MRTF-SRF シグナルをポジティブにフィードバックすることで、さらなる筋線維芽細胞のアクチン骨格形成と線維化の悪化に寄与する(18)(Figure III)。しかしながら、これまで筋線維芽細胞の MRTF-SRF シグナルを制御し、アクチン骨格形成を担う分子は、意外にもあまり報告されていない。

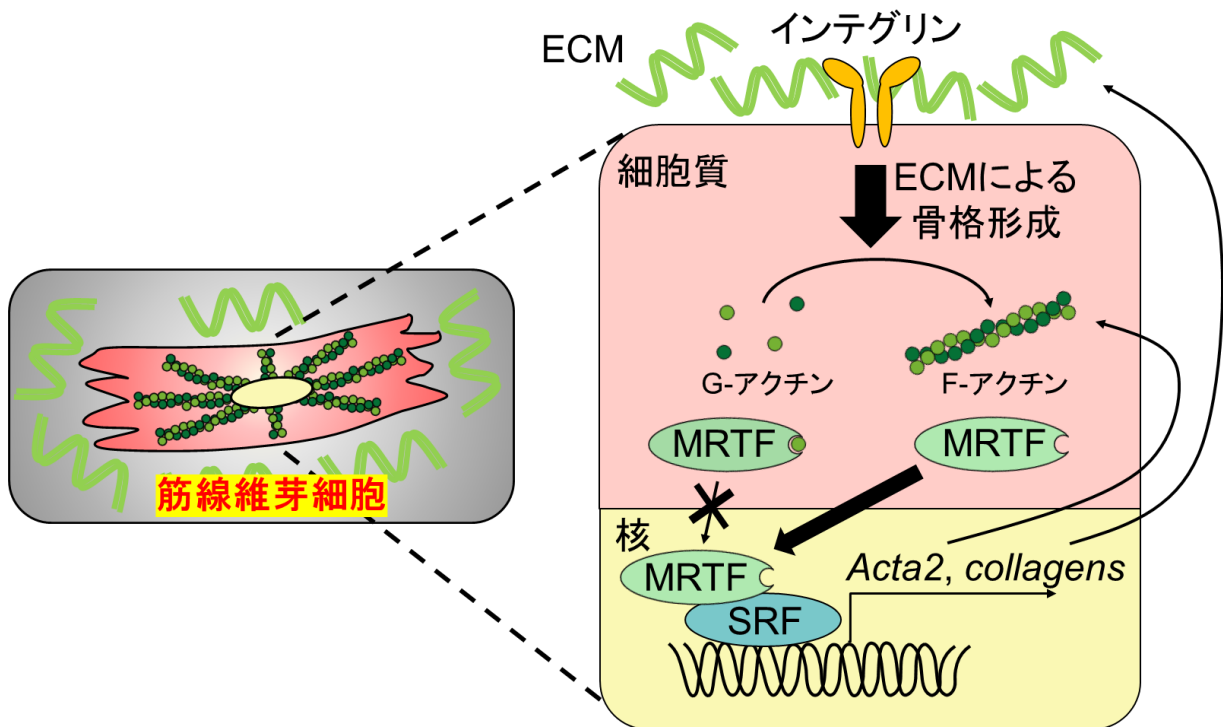


Figure III. 筋線維芽細胞における MRTF-SRF シグナル

遺伝子 *Dbn1* によりコードされるタンパク質 developmentally regulated brain protein (*drebrin*)はニワトリにおいて、脳の発達に関与するタンパク質として同定された(19)。その後の研究で、*drebrin* はアクチン結合タンパク質であり、分子内に 2 つのアクチン結合ドメインを有していることが明らかになった(20–22)。実際に、*drebrin* は F-アクチンに結合し、その脱重合を阻害することで F-アクチンを安定化させることが報告された(23)(Figure IV)。このような F-アクチンを介した *drebrin* の機能は脳の細胞において盛んに研究が行われてきた(20, 24, 25)。その一方で、*drebrin* の脳の細胞以外での役割は、未だほとんど明らかになっていない。

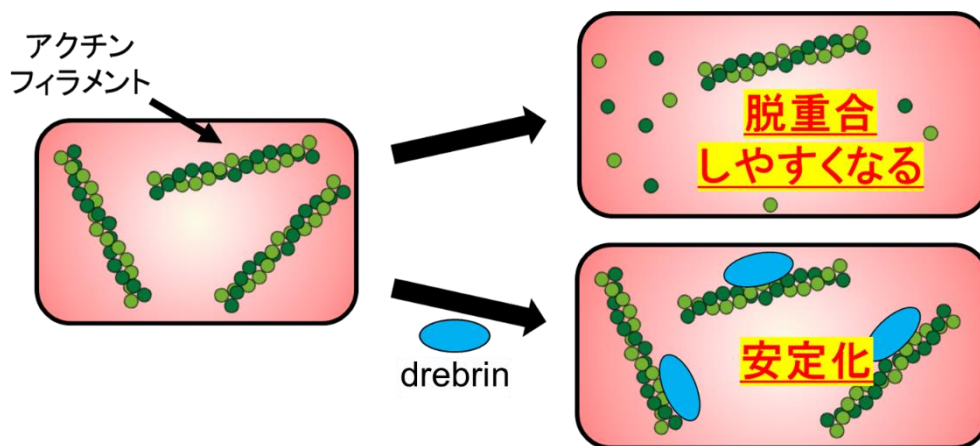


Figure IV. *drebrin* による F-アクチンの安定化

Collagen triple helix repeat containing 1 (*Cthrc1*)はバルーンによる障害に伴って細胞動脈に高く発現が誘導される分泌タンパク質として同定された(26)。*Cthrc1* は TGF- β シグナルをはじめとする様々なシグナルを制御するため、多くの腫瘍の形成、増殖、転移に関与することが報告されている(27)。さらに、最近のシングルセル解析の結果により、*Cthrc1* は心臓、肺の線維化の進行に関わる重要な筋線維芽細胞のマーカーになる可能性が示された(28, 29)。また、マーカー分子になるのみならず、MI による心臓の線維化や四塩化炭素 (CCl_4 : carbon tetrachloride)、チオアセトアミド (TAA: thioacetamide)による肝臓の線維化を促進することが明らかになった(28, 30)。しかしな

がら、Cthrc1 の発現を制御するメカニズムはほとんど明らかになっていない。

本研究では、正常な組織にはほとんど発現せず、線維化時に筋線維芽細胞に発現し、線維化関連因子の産生を促進する分子について特にアクチン骨格形成に関与する分子に着目して探索した。その結果、アクチン結合タンパク質 **drebrin** を同定した。そこで本研究では、**drebrin** の線維化促進メカニズムの解析を行うことを目的とし、実験を行った。

方法

試薬など

本研究で使用した試薬などは以下の会社より購入した。

ペントバルビタールナトリウム (東京化成工業株式会社)

イソフルラン (和光純薬工業株式会社)

ブレオマイシン塩酸塩製剤 (日本化薬株式会社)

Saline (株式会社大塚製薬工場)

四塩化炭素(CCl_4) (Sigma)

コーン油 (Sigma)

choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD) (Research Diets)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)

Penicillin-Streptomycin (nacalai tesque)

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (nacalai tesque)

Collagenase Type II (Worthington Biochemical)

Elastase (Worthington Biochemical)

PBS (nacalai tesque)

Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche)

Accutase (nacalai tesque)

CD45 Microbeads (Miltenyi Biotec)

HEPES 溶液 (nacalai tesque)

EDTA 溶液 (nacalai tesque)

HBSS (nacalai tesque)

Collagenase A (Roche)

Liberase TM research grade (Roche)

Fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma)

DL- β -hydroxybutyric acid (Sigma)

X-tremeGENE 9 (Roche)

Viofectin Transfection Reagent (Viogene)

PEI-MAX (Polysciences)

Polybrene (Sigma)

Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)

RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)

Trypsin-EDTA (nacalai tesque)

HCl (和光純薬工業株式会社)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma)

TGF- β 1 (R&D)

DMSO (和光純薬工業株式会社)

SIS3 (Cayman)

CCG-1423 (Sigma)

H₂O (nacalai tesque)

Y27632 (和光純薬工業株式会社)

ISOGEN (ニッポンジーン)

Tris (和光純薬工業株式会社)

NaCl (nacalai tesque)

NP-40 (nacalai tesque)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (和光純薬工業株式会社)

Sodium deoxycholate (和光純薬工業株式会社)

2-Mercaptoethanol (和光純薬工業株式会社)

Protease inhibitor cocktail (nacalai tesque)

Phosphatase inhibitor cocktail (nacalai tesque)

Glycerol (nacalai tesque)

Bromophenol Blue (Sigma)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs)

Paraformaldehyde (PFA) (nacalai tesque)

Sucrose (nacalai tesque)

Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound (Sakura Finetek)

Triton X-100 (polyoxyethylene (10) octylphenyl ether) (和光純薬工業株式会社)

DAPI solution (Dojindo)

FluorSave Reagent (Millipore)

RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (Advanced Cell Diagnostics)

RNAscope[®] probe-C1 anti-mouse Dbn1 (Advanced Cell Diagnostics)

TSA Plus Cyanine 3 (Perkin Elmer)

Poly-L-lysine (Sigma)

HEPES (Dojindo)

NaOH (nacalai tesque)

EGTA (nacalai tesque)

MgCl₂ (nacalai tesque)

NE-PER[™] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific)

Tween 20 (和光純薬工業株式会社)

anti-FLAG(DYKDDDDK) Antibody Magnetic Beads (和光純薬工業株式会社)

Western Lightening Plus (PerkinElmer)

Anti- α -SMA antibody (Thermo Fisher Scientific #MS-113-P) (ウエスタンブロッティング用)

Anti- β -actin antibody (Proteintech #20536-1-AP)

Anti-Collagen I antibody (CST #72026)

Anti-Desmin antibody (abcam #ab15200)

Anti-drebrin 抗体 (abcam #ab11068) (免疫組織染色用)

Anti-drebrin 抗体 (富士フィルム #011-27273) (ウエスタンブロッティング用)

Anti-GAPDH antibody (Santa Cruz # sc-32233)

Anti-lamin A/C antibody (Proteintech #10298-1-AP)

Anti-Mkl1 antibody (Proteintech #21166-1-AP)

Anti-SM22 α antibody (abcam #ab14106)

Anti-Tnni3 antibody (abcam #ab56357)

Anti-FLAG-HRP (Sigma #A8592)

Anti-HA-HRP (Roche #12013819001)

Anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz # sc-2005)

Anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz # sc-2004)

Anti-mouse IgG-HRP (abcam # ab6789)

Anti-rabbit IgG-HRP (abcam # ab6721)

Anti-mouse IgG-HRP (CST #7076)

Anti-rabbit IgG-HRP (CST # 7074)

Cy3-conjugated anti- α -SMA antibody (Sigma #C6198) (免疫組織染色用)

Phalloidin-iFluor 488 Reagent (abcam #ab176753)

AlexaFluor 488[®]-conjugated anti-CD45.2 antibody (BioLegend #109816)

APC-conjugated anti-PDGFR α antibody (BioLegend #135908)

AlexaFluor 488[®]-conjugated donkey anti-goat IgG (abcam #ab150129)

Alexa Fluor 488[®]-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen #A21206)

Alexa Fluor 594[®]-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories #711-585-152)

実験動物

6 – 10 週齢の C57BL/6J 野生型雄性および雌性マウス、C57BL/6N 野生型雄性マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。すべてのマウスはプラスチックケージの中で群飼育(4 匹まで)した。マウスは自由飲水にし、適切な温度、湿度条件下で、12 時間の明暗周期で飼育し、実験に用いた。

心筋梗塞モデルマウスの作製

心筋梗塞モデルマウスには 8 – 10 週齢の C57BL/6J 野生型雄性マウスを用いた。ソムノペンチル注射液(50mg/kg ペントバルビタールナトリウム)をマウス腹腔内に投与した後、仰臥位で手術台に固定を行った。頸部および胸部を剃毛した後、頸部を切開し、気管を露出し、カニューレを気管に挿入した。その後、一回呼吸量 0.4cc、呼吸回数 120 回/分で人工呼吸を行いながら、施術を行った。心筋梗塞施術は肋骨左側の第二肋間の切開により心臓を露出させ、左冠動脈前下行枝を 8-0 絹ブレード縫合糸で結紮することで行った。その後、切開箇所を縫合糸で縫合し、閉胸を行った。以上の施術を行ったマウスを心筋梗塞群(Myocardial infarction; MI)とし、左冠動脈前下行枝に 8-0 絹ブレード縫合糸を通した後、結紮を行わない施術を行ったマウスを偽処置 (sham) 群とした。

ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスの作製

ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスには 6–8 週齢の C57BL/6J 野生型雌性マウスを用いた。ソムノペンチル注射液(50mg/kg ペントバルビタールナトリウム)をマウス腹腔内に投与した後、仰臥位で手術台に固定を行った。頸部を剃毛した後、頸部を切開し、気管を露出し、カニューレを気管に挿入した。その後、カニューレにシリンジを通し、Saline に溶かしたブレオマイシン溶液 1.5 mg/kg で単回投与することで炎症およびそれに伴う線維化を誘導した。

四塩化炭素(CCl₄)誘発肝線維症モデルマウスの作製

CCl₄ 誘発肝線維症モデルマウスには 8–10 週齢の C57BL/6J 野生型雄性マウスを用いた。CCl₄ をコーン油に溶かし(CCl₄:コーン油 = 1:4)、5 mL/kg で腹腔内投与を行う。週 2 回を 4 週間投与することで肝障害に伴う炎症および線維化を誘導した。

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスの作製

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスには 6 週齢の C57BL/6N 野生型雄性マウスを用いた。超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD, 60 kcal% 脂肪含有量、ラード使用、コリン欠乏、メチオニン減量(0.1%)) を 0–12 週間給餌させることで脂肪肝およびそれに伴う線維化を誘導した。

細胞培養

HEK293T 細胞、Plat-E 細胞、NIH3T3 細胞、マウス心臓、肺の筋線維芽細胞、肝臓の活性化肝星細胞、ラットの線維芽細胞は 10% FBS / 1% Penicillin-Streptomycin / DMEM 培地中で、ヒト肝星細胞株 LX-2 細胞は 2% FBS / 1% Penicillin-Streptomycin / DMEM 培地中で、37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養を行った。

フローサイトメトリーあるいは磁気細胞分離法を用いた線維化マウス心臓、肺からの筋線維芽細胞の単離

MI 処置 3 日後のマウスから線維化した心臓を回収し、心房を取り除いた後、小鋏を用いて 4 分割する。次に、PBS で洗浄した後、Collagenase type II 溶液 (0.1% Collagenase type II / 0.01% Elastase / PBS) を加え、37 °C 10 分間の振盪を行うことで酵素処理を行った。その後、70 μ m のフィルターに通した後、遠心(300G, 5 分間)を行い、筋線維芽細胞を含む細胞ペレットを回収した。この操作を、心臓が溶けきるまで(3 – 4 回)繰り返した。回収した細胞は Red Blood Cell Lysis Buffer を用いて、血球系成分を除去した後、培養プレートに播種した。その 6 – 8 時間後に培地交換を行い、非接着系の細胞やデブリスの除去を行った。その後一晩、37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養した後、PBS でよく洗浄し、Accutase を用いて接着細胞を回収した。

回収した接着細胞は CD45 抗体あるいは PDGFR α 抗体で染色し、FACS Aria sora を用いて解析、分離を行った。CD45 陽性細胞をマクロファージ、PDGFR α 陽性細胞を筋線維芽細胞として実験に用いた。

一方で、MS カラムを用いた磁気細胞分離法(MACS: magnetic-associated cell sorting)にて筋線維芽細胞を単離する際には、まず回収した接着細胞に抗 CD45 Microbeads を 20 分間反応させた。その後、CD45 陽性の血球系細胞を除去し、CD45 陰性細胞を筋線維芽細胞として実験に用いた。

肺の筋線維芽細胞の単離に関しては、ブレオマイシン投与 7 日後のマウスの線維化した肺を用いた。すべての肺の葉を回収し、それぞれ 2–6 分割した後、心臓の際と同様の操作を行い、肺の筋線維芽細胞を単離した。

磁気細胞分離法を用いた線維化マウス肝臓からの活性化肝星細胞の単離

CCl₄ 投与 4 – 6 週間後あるいは CDAHFD 給餌 6 – 10 週間後のマウスから線維化した肝臓を摘出し、Washing buffer (25 mM HEPES / 500 nM EDTA / HBSS)を用いて洗浄した。次に、肝臓を Digestion buffer (0.1% Collagenase A / 15 mM HEPES / HBSS)に入れ、動物用メスを用いて、細かく分割した。その後、肝臓片を Digestion buffer 中で 37 °C 15 分間の振盪を行うことで酵素処理を行った。その後、70µm のフィルターに通した後、肝細胞を除くために低速遠心(50G, 1 分間)を行い、上清を回収した。その上清を再び遠心(300G, 5 分間)し、活性化肝星細胞を含む細胞ペレットを回収した。この操作を、肝臓が溶けきるまで(3 – 4 回)繰り返した。回収した細胞は Red Blood Cell Lysis Buffer を用いて、血球系成分を除去した後、培養プレートに播種した。その 6 – 8 時間後に培地交換を行い、非接着系の細胞やデブリスの除去を行った。その後一晩、37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養した後、PBS でよく洗浄し、Accutase を用いて接着細胞を回収した。回収した接着細胞に CD45 Microbeads を 20 分間反応させた。その後、MS カラムを用いた MACS(磁気細胞分離法)により、CD45 陽性の血球系細胞を除去し、CD45 陰性細胞を活性化肝星細胞 (筋線維芽細胞) として実験に用いた。

新生児ラット心臓からの常在性線維芽細胞の単離

新生児 SD ラットは、九動株式会社より購入した。哺育 1 日目の新生児ラットを氷冷麻酔した後に心臓を回収し、心房を取り除いた後、小鋏を用いて 4 分割した。次に、PBS で洗浄した後、Collagenase cocktail (2 mg/mL liberase TM research grade / 1 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin / 1 mg/mL DL-β-hydroxybutyric acid / PBS) を加え、37 °C 7 分間の振盪を 6 回行うことで酵素処理を行い、線維芽細胞を含む細胞液を回収した。回収した細胞は培養プレートに播種し、37°C、5% CO₂ インキュベ

ーター内で 1 時間培養した後に、培地交換を行い、非接着系の細胞やデブリスの除去を行った。培養プレートに接着している細胞を心臓の常在性線維芽細胞として実験に用いた。

培養細胞への遺伝子導入

NIH3T3 細胞への遺伝子導入は X-treamGENE 9、Viofectin Transfection Reagent あるいは PEI-MAX を用いて行った。

レトロウイルスを用いた培養細胞への遺伝子導入

レトロウイルスは Plat-E 細胞に X-tremeGENE 9 を用いて、目的遺伝子を組み込んだ pMXs-puro ベクターを遺伝子導入することで産生した。遺伝子導入後 48 時間後に、Plat-E 細胞の培養上清を回収し、遠心を行い、その上清を回収することでウイルスの精製を行った。その後、ウイルス溶液に最終濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように polybrene を加え、前日に播種した NIH3T3 細胞あるいは筋線維芽細胞にこのウイルス溶液を添加することで感染を行った。感染開始 6 時間後に細胞培養培地を追加し、その 18 時間後に、新鮮な細胞培養培地に交換した。実験には、ウイルス感染後 48 時間の NIH3T3 細胞あるいは筋線維芽細胞を用いた。

培養細胞への siRNA の導入と RNA 回収

単離した心臓、肺の筋線維芽細胞、肝臓の活性化肝星細胞、また LX-2 細胞に Lipofectamine RNAiMAX により siRNA を導入した。前日にまきなおしたそれぞれの細胞にコントロール(Silencer Select Negative Control no. 1 siRNA)あるいは目的遺伝子に対する siRNA を導入した。siRNA 導入から 72 時間後に RNeasy Plus Mini Kit を用いて RNA を精製した。

本研究に用いた siRNA はすべて Thermo Fisher Scientific から購入し、それらの Code 番号は下記に記す。

Silencer Select Negative Control no. 1 siRNA (4390844)

siDbn1(#1) (s80330)

siDbn1#2 (s80331)

siCthrc1 (s86846)

siSrf (s74391)

siDBN1 (s3950)

培養細胞への TGF- β 、SIS3、CCG-1423、Y27632 処置

単離したラット新生児線維芽細胞は、Trypsin-EDTA で培養プレートから剥がした後に、6 well プレートに播種し、一晚 37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養した。その後、細胞を 0.1% FBS / 1% Penicillin-Streptomycin / DMEM で 24 時間 starvation し、Ctrl(4mM HCl / 0.1% BSA / PBS)あるいは TGF- β 1 (最終濃度 10ng/mL)で 72 時間刺激した。NIH3T3 細胞への TGF- β 処置も同様の手順で Ctrl あるいは TGF- β 1 (最終濃度 2ng/mL)を 72 時間処置した。心臓、肺の筋線維芽細胞への SIS3 処置は、0.1% FBS / 1% Penicillin-Streptomycin / DMEM で 24 時間 starvation した後に、最終濃度が 3 μ M となるように処置した。心臓、肺の筋線維芽細胞あるいは肝臓の活性化肝星細胞への CCG-1423 処置は、最終濃度 10 μ M で 24 時間行った。心臓の筋線維芽細胞あるいは肝臓の活性化肝星細胞への Y27632 処置は、最終濃度 30 μ M で 24 時間行った。

組織からの RNA、タンパク質抽出

心臓はマウスを安楽死させた後、横隔膜を開き、回収した。MI 処置後の線維化した心臓は回収した後に、梗塞領域と非梗塞領域に切り分けた。肺、肝臓はマウスに麻酔をかけ、PBS を用いて全身還流を行った後、回収した。その後、RNA の精製は ISOGEN、RNeasy Plus Mini Kit を用いて、そのプロトコルに従って行った。タンパク質は、組織を Lysis buffer 【RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 150 mM NaCl / 1% NP-40, 0.1% SDS / 0.5% Sodium deoxycholate] に 2-Mercaptoethanol、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail をそれぞれ 1/100 の濃度で加えた Buffer】に浸してホモジェナイズし、遠心(4°C, 15000 rpm, 20 min)を行った後、上清を回収することにより抽出した。その後、4×SDS sample buffer [200 mM Tris-Cl (pH 6.8) / 40% Glycerol / 4% SDS / 0.08% Bromophenol Blue] を適量加え、煮沸(95°C, 5 min)を行うことでタンパク質サンプルを作製した。

mRNA 量の測定

細胞あるいは組織から回収した RNA は微量分光光度計 DS-11 (DeNovix) を用いて濃度を測定した。その後、mRNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて、cDNA へと逆転写した。mRNA 量の測定は、Luna Universal qPCR Master Mix のプロトコルに従って行い、GAPDH または 18S rRNA を内部標準にした $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により発現量の比較を行った。

測定に用いたプライマーおよび TaqMan プローブは Applied Biosystems あるいは Sigma-Aldrich から購入し、以下にプローブ ID あるいはその配列を示す。

Rat *Acta2* (Assay ID: Rn01759928_g1)

Mouse *Mkl2* (Assay ID: Mm00463877_m1)

Mouse *Acta2*:

Fw: 5'-CACCATGAAGATCAAGATCATTGCC-3'

Rv: 5'-GGTAGACAGCGAAGCCAGGA-3'

Probe: 5'-FAM-AGCCACCGATCCAGACAGAGTACTTGCG-TAMRA-3'

Human *ACTA2*:

Fw: 5'-GATCCTGACTGAGCGTGGC-3'

Rv: 5'-GGTAGACAGCGAAGCCAGGA-3'

Probe: 5'-FAM-ATTCCTTCGTTACTACTGCTGAGCGTGAGA-TAMRA-3'

Mouse *Actb*:

Fw: 5'-CGCAGCCACTGTCGAGTC-3'

Rv: 5'-TCATCCATGGCGAACTGGTG-3'

Probe: 5'-FAM-AGCTCCTTCGTTGCCGGTCCACAC-TAMRA-3'

Mouse *Cd68*:

Fw: 5'-CCGCTTATAGCCCAAGGAACA-3'

Rv: 5'-TTCTGTGGCTGTAGGTGTCATC-3'

Probe: 5'-FAM-AAAGGCCGTTACTCTCCTGCCATCCT-TAMRA-3'

Mouse *Colla1*:

Fw: 5'-CCCAAAGGTTCTCCTGGTGAAG-3'

Rv: 5'-CGGTTTTGCCATCAGGACCA-3'

Probe: 5'-FAM-TGGTGCCAAGGGTCTCACTGGCAGTC-TAMRA-3'

Human *COL1A1*:

Fw: 5'-ACTGGTGACCTGCGTGTA-3'

Rv: 5'-GCCGCATACTCGAACTGG-3'

Probe: 5'-FAM-CTCTCGCCAACCAGACATGCCTCTTG-TAMRA-3'

Mouse *Col3a1*:

Fw: 5'-AAGCCCTGATGGTTCTCGAAA-3'

Rv: 5'-CTTGCAGCCTTGGTTAGGATC-3'

Probe: 5'-FAM-ACCCAGTATTCTCCACTCTTGAGTTCGG-TAMRA-3'

Human *COL3A1*:

Fw: 5'-CCCGAGGTGCTCCTGGTC-3'

Rv: 5'-CGATGTCCTTTGATGCCAGCA-3'

Probe: 5'-FAM-CCACGTTACCTGTTTCACCTTTGTCACCA-TAMRA-3'

Mouse *Coll4a1*:

Fw: 5'-TGGGCCAGTAAAGACAGATGC-3'

Rv: 5'-GCAAGAGCAGGACCGTGGA-3'

Probe: 5'-FAM-CAGGACTCTTCATCCCGCAGACCAGGAA-TAMRA-3'

Mouse *Cthrc1*:

Fw: 5'-ATGCGCTCCAACAGTGCTC-3'

Rv: 5'-TGGTCCAGATAGATGATGGCTTC-3'

Probe: 5'-FAM-TCTGTTTCAGTGGCTCGCTTCGGCTCA-TAMRA-3'

Mouse *Dbn1*:

Fw: 5'-CCTCCACCAACTCAAGAGGC-3'

Rv: 5'-GCTTTGCAACAGGGGAGGTT-3'

Probe: 5'-FAM-CCCAGACCTCAGGAGCTGCTGTTACTTTG-TAMRA-3'

Human *DBN1*:

Fw: 5'-GGCCCTGGATGAGGTCACC-3'

Rv: 5'-GGCTCCTGGGTCTCTTGGG-3'

Probe: 5'-FAM-CCTCCACCACTGCCACCGCCAC-TAMRA-3'

Rat *Dbn1*:

Fw: 5'-AGCAGTTTTGGGAGCAGGC-3'

Rv: 5'-TGGCATCCAAAGCCTTCTTCC-3'

Probe: 5'-FAM-CTCCTTCCGCAGCTCCTCCTCCTTCT-TAMRA-3'

Mouse *Gapdh*:

Fw: 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGA-3'

Rv: 5'-CCACTTTGCCACTGCAAATGG-3'

Probe: 5'-FAM-CCAATACGGCCAAATCCGTTACACCGA-TAMRA-3'

Human *GAPDH*:

Fw: 5'-TGGGCTACACTGAGCACCAG-3'

Rv: 5'-GCCAAATTCGTTGTCATACCAGG-3'

Probe: 5'-FAM-TTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACC-TAMRA-3'

Mouse *Lox*:

Fw: 5'-CAAGCTGGTTTCTCGCCGTC-3'

Rv: 5'-TGTAGGGGTCGTCGCCCA-3'

Probe: 5'-FAM-ATCGCCACAGCCTCCGCAGCTCAG-TAMRA-3'

Mouse *Mkl1*:

Fw: 5'-CCCACATCTCTGCTGAAGAAGG-3'

Rv: 5'-GACTGGAGGAGCCATTTTCCTG-3'

Probe: 5'-FAM-AGGCTGCTGGGTCACAGTCTCTTCATAAC-TAMRA-3'

Mouse *Tagln*:

Fw: 5'-TGACGAGGAGCTGGAGGAG-3'

Rv: 5'-ACAGGCTGTTACCAATTTGC-3'

Probe: 5'-FAM-AATCACACCATTTCTCAGCCACACCTGGAA-TAMRA-3'

Mouse / Rat *18S rRNA*:

Fw: 5'-GGGTCATAAGCTTGCGTTGATTAAG-3'

Rv: 5'-TCCGAGGGCCTCACTAAACC-3'

Probe: 5'-FAM-TACACACCGCCCGTCGCTACTACCG-TAMRA-3'

Data were normalized to *Gapdh* or *18S rRNA* levels.

RNA-Seq 解析

精製した RNA は Macrogen Japan に依頼し、RNA-Seq 解析を行った。具体的には、ライブラリーの調整は TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いて行い、Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) によりシークエンスを読み込んだ。読み込んだシークエンスは FastQC を用いて解析し、Trimmomatic program によりアダプター配列や品質の低い断片を除去した。その後、HISAT2 を用いてマウスゲノム配列(mm10)にマッピングを行い、StringTie を用いて標準化し、TPM 値を算出した。MA plot は TPM 値を用いて、y 軸に変化率を $M = \text{Log}_2(\text{siDbn1} / \text{siCtrl})$ 、x 軸に平均発現量を $A = \text{Log}_2[(\text{siDbn1} + \text{siCtrl}) / 2]$ で作製した。MA plot の結果から、筋線維芽細胞における発現量が高く、siDbn1 で発現が減少する分子群 ($A > 0, M < -1.0$) を Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources version 6.8 を用いて解析した。解析により得られた Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway のうち、遺伝子数が 25 より多く認められたものを示した。

心臓の線維化を伴うヒト患者のデータセットは(GSE116250)、肺の線維化を伴う患者のデータセットは(GSE92592)、肝臓の線維化を伴うヒト患者のデータセットは(GSE162694)である。目的の遺伝子の線維化時の発現量は raw count を標準化した後、Ctrl 群と比較することで算出した。

免疫組織染色

マウスから摘出した心臓、肺は 4% PFA 溶液に浸して、4°C で一晩固定した。その後、10%、15%、20% sucrose 溶液にそれぞれ 4 時間以上浸し、Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound を用いて包埋した。凍結標本は、クリオスター NX70 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 6 μm に薄切し、スライドガラスに張り付けた。

スライドガラスに張り付けた凍結切片は1時間の風乾後、0.1% Triton X-100 / PBS を用いて5分間膜透過処理し、5% BSA / 0.1% Triton X-100 / PBS を用いて1時間ブロッキングした。その後、5% BSA / 0.01% Triton X-100 / PBS により希釈した一次抗体を4°Cで一晩反応させ、PBS で5分間3回の洗浄を行った後、5% BSA / 0.01% Triton X-100 / PBS に希釈した蛍光標識二次抗体を常温で1時間反応させた。PBS による5分間、3回の洗浄後、DAPI を用いて核染色し、FluorSave Reagent を用いて封入した。撮像は共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて行った。

***In situ* hybridization**

免疫組織染色と同様の手順で心臓、肝臓を4% PFA により固定化した後に、クリオスターNX70 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、心臓は6 μm、肝臓は10 μm に薄切し、スライドガラスに張り付けた。

スライドガラスに張り付けた凍結切片は1時間の風乾後、RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 を用いて、そのプロトコルに従い、*In situ* hybridization を行った。具体的にはPBS で洗浄した後、過酸化水素溶液を室温で10分間反応させ、内在性のペルオキシダーゼを不活性化させた。その後、プロテアーゼ溶液をHybEZ™ オープン (Advanced Cell Diagnostics) 内で40°C、30分間反応させた後、*Dbn1* mRNA に対するプローブあるいはネガティブコントロールのプローブをHybEZ™ オープン内で40°C、2時間反応させた。以上のようにして、ハイブリダイズさせたプローブは各種 Amp 溶液、HRP 溶液、TSA Plus Cyanine 3 とHybEZ™ オープン内にて40°Cで順次反応させることで、そのシグナルを増幅させ、*Dbn1* mRNA のシグナルを検出した。

抗体との共染色の際は、上記の操作の後に、10% BSA を室温で1時間反応さ

せ、ブロッキングを行った。その後、10% BSA/PBS に希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させ、PBS で 5 分間 3 回の洗浄を行った後、10% BSA / PBS に希釈した蛍光標識二次抗体を常温で 1 時間反応させた。PBS による 5 分間 3 回の洗浄を行った後、DAPI を用いて核染色し、FluorSave Reagent を用いて封入した。撮像は共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて行った。

免疫細胞染色

siRNA 導入したマウス心臓の筋線維芽細胞を Poly-L-lysine で 30 分間コーティングした $\phi 35$ mm glass bottom dish に播種し、一晩、37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養した。培養した筋線維芽細胞は 4% PFA で 15 分間固定し、0.1% Triton X-100 / PBS を用いて 5 分間膜透過処理を行った後、5% BSA / 0.1% Triton X-100 / PBS を用いて 1 時間ブロッキングを行った。その後、5% BSA / 0.01% Triton X-100 / PBS に希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させ、PBS で 5 分間 3 回の洗浄を行った後、5% BSA / 0.01% Triton X-100 / PBS に希釈した蛍光標識二次抗体を常温で 1 時間反応させた。PBS による 5 分間 3 回の洗浄後、DAPI を用いて核染色し、FluorSave Reagent を用いて封入した。撮像は共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて行った。

ファロイジン染色には、上記の方法で筋線維芽細胞を固定化、透過処理を行った後、1% BSA / PBS に希釈した Phalloidin-iFluor 488 Reagent を常温で 1 時間反応させた。その後、PBS による 5 分間 3 回の洗浄を行い、DAPI を用いて核染色し、FluorSave Reagent を用いて封入した。撮像は共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて行った。

MRTF の局在、ファロイジンの定量は Image J ソフトウェア (NIH) を用いた画像解析による平均輝度から算出した。

培養細胞からのタンパク質抽出

遺伝子導入した NIH3T3 細胞あるいは筋線維芽細胞は PBS で洗浄し、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail を 1/100 の濃度で加えた RIPA buffer あるいは Lysis buffer [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) / 150 mM NaCl / 1% NP-40, 0.05% SDS / 0.25% Sodium deoxycholate / 1 mM EGTA / 1mM MgCl₂]に浸して、4°C で 20 分間インキュベートした。その後、スクレーパーを用いて細胞を掻きとり、細胞溶解液を回収した。細胞溶解液は遠心(4°C, 15000 rpm, 20 min)した後、その上清を回収し、2-Mercaptoethanol を 1/25 の濃度で加えた 4×SDS sample buffer を適量加え、煮沸(95°C, 5 min)を行うことでタンパク質サンプルとした。

筋線維芽細胞内のコラーゲン抽出には、上記の方法と同様に筋線維芽細胞を Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail を加えた RIPA buffer に浸してインキュベートし、スクレーパーを用いて細胞溶解液を回収した後、2-Mercaptoethanol を 1/100 の濃度で加え、煮沸(95°C, 10 min)を行った。その後、細胞溶解液を遠心(4°C, 15000 rpm, 20 min)し、その上清を回収し、4×SDS sample buffer を適量加え、コラーゲン検出用タンパク質サンプルとした。

筋線維芽細胞の核タンパク質抽出は、NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents のプロトコルに従った。得られた核画分の上清に 4×SDS sample buffer を適量加え、サンプルを作製した。

免疫沈降

遺伝子導入した NIH3T3 は PBS で洗浄し、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail を 1/100 の濃度で加えた Lysis buffer に浸して、4°C で 20 分間インキュベートした。その後、スクレーパーを用いて細胞を掻きとり、細胞溶解液を回収した。細胞溶解液は 2 回遠心(4°C, 15000 rpm, 20 min)を行い、回収した上

清に anti-FLAG(DYKDDDDK) Antibody Magnetic Beads を加え、4°Cで一晩ローターを用いて攪拌しながら反応させた。翌日、磁石スタンド(多摩川精機)を用いて4°Cで RIPA buffer による7回洗浄を行い、2-Mercaptoethanol を加えた2×SDS sample buffer を加え、95°Cで5分間煮沸を行った後、DynaMag-2(Invitrogen)を用いて免疫沈降されたタンパク質サンプルを回収した。

ウエスタンブロッティング

回収したタンパク質サンプルは SDS-PAGE を用いて分離した後、転写装置を用いて、PVDF 膜 (GE Healthcare) に転写した。その後、PVDF 膜は 5% Skim milk /TBS-T [20 mM Tris-Cl (pH7.4) / 137 mM NaCl / 0.2% Tween-20] を用いて、室温で1時間ブロッキングし、TBS-T に希釈した一次抗体を4°Cで一晩反応させた。翌日、TBS-T で10分間3回の洗浄を行った後、TBS-T に希釈した HRP 標識二次抗体を常温で1時間反応させた。その後、再び TBS-T で10分間3回の洗浄を行った後、Western Lightening Plus を用いて発光させ、ChemiDoc イメージングシステム (Bio-rad)を用いて、露光、撮像を行った。

scRNA-Seq 解析

心筋梗塞後3日目、7日目のマウス心臓間質細胞の scRNA-Seq データセット (E-MTAB-7376)、CCl4 投与後のマウス肝臓細胞の scRNA-Seq データセット (GSE171904) をダウンロードした。ダウンロードしたデータは R パッケージの Seurat を用いて解析した。まず、データセットのうち200遺伝子以下の細胞あるいは3細胞以下でしか認められない遺伝子を解析から除き、加えて全遺伝子に占めるミトコンドリア遺伝子の割合が10%(心臓)あるいは20%(肝臓)以上の細胞を解析から除いた。その後、遺伝子発現を標準化した後、次元削減を行うた

めの特徴的な 2000 遺伝子を選択した。その後、データをスケーリング、次元削減を行い、UMAP を用いてクラスター化した細胞を可視化させた。2 つの集団間で発現が変動している遺伝子は Seurat で解析を行い、そのヒートマップは ggplot2 を用いて作成した。Drebrin 陽性細胞で豊富な遺伝子($\log_2(\text{fold change}) > 0.2$)は DAVID Bioinformatics Resources version 6.8 を用いて解析した。

統計解析

実験は 3 回以上行い、再現性を確認した上で、代表的な結果を Figure に示した。統計解析は GraphPad Prism 5.0 software を用いて計算し、 $\text{means} \pm \text{SD}$ で表示した。ヒト線維化患者データは箱ひげ図(Tukey 法)を用いて表した。2 群間での有意差検定には unpaired t-test を用いて、多群間での有意差検定には One-way ANOVA による Tukey's range test を用いて比較した。P < 0.05 の場合に有意差があるとみなした。

結果

アクチン結合タンパク質 drebrin は心臓の線維化時に発現増加する

組織の線維化時に筋線維芽細胞に発現し、コラーゲン産生を促進する分子を同定するため、心臓の線維化時に発現増加する分子の探索を行った。まず、心臓の線維化を誘導するため、心臓左冠動脈前下行枝を結紮し、心筋梗塞(Myocardial Infarction: MI)モデルマウスを作製した(Fig. 1A)。Sham 群(偽処置群=非線維化群)の心臓と MI 群(線維化群)の心臓からそれぞれ RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。「正常時のマウス心臓に発現が少ない」および「線維化時に大きく発現増加する」を指標に選別した結果、多くの遺伝子群が同定された。

筋線維芽細胞の主たる特徴の一つとして、アクチン骨格が発達していることが挙げられる。そこで私は、上記の遺伝子群のうち、アクチン骨格形成に関与する可能性がある分子に特に着目して探索した結果、アクチン結合タンパク質である、drebrin (遺伝子名 *Dbn1*)を見出した (Fig. 1B)。

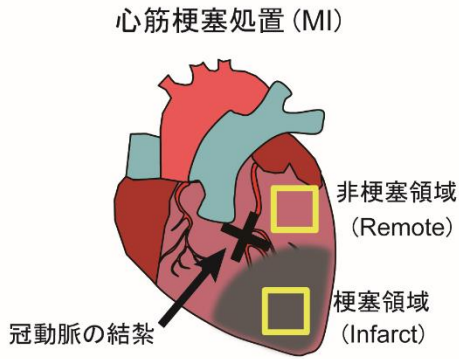
実際に、drebrin が線維化時に発現増加するかを確かめるために、MI 処置を施したマウスの心臓を経時的(0, 3, 7, 28 日後)に回収し、qRT-PCR を行った。その結果、drebrin (*Dbn1*)の発現量は、筋線維芽細胞が産生する細胞外マトリックスの 1 つである Collagen1a1 (*Coll1a1*)や筋線維芽細胞のマーカー分子である α -SMA

(*Acta2*)の発現量と同じく、MI 後 3、7 日目で増加した(Fig. 1C, D)。この結果に一致して、drebrin のタンパク質量も MI 処置後 3、7 日目の心臓において、その発現増加が認められた(Fig. 1E)。

次に、drebrin の心臓の線維化時における発現増加は、ヒト患者でも認められるかを検討した。心筋梗塞を含む虚血性心筋症(ICM:ischemic cardiomyopathy)患者の心臓 RNA を用いた RNA-Seq(GSE116250)(31)の公開データを解析し、drebrin の発現量を調べた。その結果、drebrin(*DBN1*)の発現量は、健常な心臓(NF: non-failing)に比べて、虚血性心筋症の心臓で有意に増加していることが明らかになった(Fig. 1F)。

以上の結果から、アクチン結合タンパク質 drebrin はマウスおよびヒト患者の心臓線維化時に、発現増加することが明らかになった。

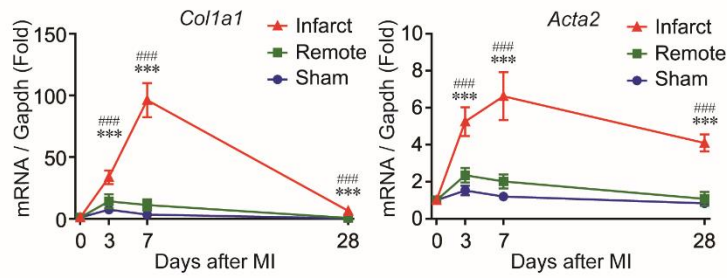
A



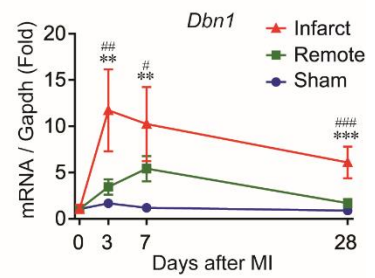
B



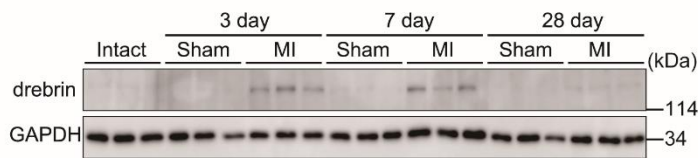
C



D



E



F

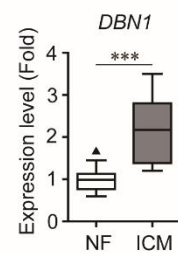


Figure 1. Drebrin expression is increased in fibrotic hearts in mice and human patients.

(A) A schematic image of MI-operated mouse heart.

(B) The way to identify an actin binding protein, drebrin which might be involved with fibrosis. By using microarray analysis, the genes that are not expressed in the normal heart and are greatly upregulated in the heart during fibrosis were selected. Among them, proteins involved in actin cytoskeleton formation were selected. Through these steps, drebrin was identified.

(C) *Coll1a1* and *Acta2* mRNA expression levels in mouse hearts after MI. Total RNA extracted from each area of mouse hearts were subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001 Infarct vs Sham, ####P < 0.001 Infarct vs Remote. n = 3-6.

(D) *Dbn1* mRNA expression levels in mouse hearts after MI. Total RNA extracted from each area of mouse hearts were subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01 Infarct vs Sham, ####P < 0.001, ##P < 0.01, #P < 0.05 Infarct vs Remote. n = 3-6.

(E) The protein expression levels of drebrin in mouse hearts after MI. Whole mouse hearts were lysed and subjected to western blot with antibodies against drebrin. n = 3.

(F) *DBN1* mRNA expression levels in the non-failing (NF) hearts and the hearts of ischemic cardiomyopathy (ICM) patients using data from GSE116250. Data are presented as the box and whisker plot (tukey style, outliers in black triangles). ***P < 0.001. n = 14 (NF), n = 13 (ICM).

drebrin は MI 後の線維化したマウス心臓の筋線維芽細胞に特異的に発現する

次に drebrin が線維化時の心臓のどの細胞に発現するかを調べるために、偽処置あるいは MI 処置後 3、7 日目の心臓の間質細胞（心筋細胞以外）の scRNA-Seq(E-MTAB-7376)(32)データを解析した。そして、各種マーカー分子の発現から、心臓の間質細胞を線維芽細胞(筋線維芽細胞を含む)、マクロファージ、内皮細胞、T 細胞、B 細胞、壁細胞の 6 つのクラスターに分類した(Fig. 2A)。このデータセットを用いて drebrin(*Dbn1*)の発現を解析したところ、*Dbn1* は筋線維芽細胞を含む線維芽細胞のクラスターに、特異的に発現することが明らかになった(Fig. 2B)。さらに、心臓の間質細胞以外の実質細胞である心筋細胞に *Dbn1* が発現するかを、高感度 *In situ* hybridization により検討したところ、*Dbn1* は心筋細胞に発現していなかった(Fig. 2C)。

次に、drebrin (*Dbn1*)が実際に線維化した心臓の筋線維芽細胞に発現するかを確かめるために、MI 処置により線維化した心臓からフローサイトメトリーを用いてマクロファージおよび筋線維芽細胞を単離し、*Dbn1* の発現量を解析した。マクロファージと筋線維芽細胞の純度は、それぞれのマーカー分子である *Cd68* あるいは *Colla1* の発現によって確認した(Fig. 2D)。その結果、*Dbn1* は線維化した心臓の筋線維芽細胞に発現していた(Fig. 2D)。

最後に、drebrin タンパク質が線維化した心臓の組織切片において、筋線維芽細胞に特異的に発現するかを、免疫組織染色により解析した。その結果、drebrin のシグナルは正常時の心臓(Sham)には全く認められず、線維化した心臓にのみ認められた(Fig. 2E)。さらに、drebrin のシグナルは、筋線維芽細胞のマーカ分子として知られる α -SMA を発現している細胞に、多く認められることを見出した(Fig. 2E)。

以上の結果から、drebrin は線維化した心臓において、筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかになった。

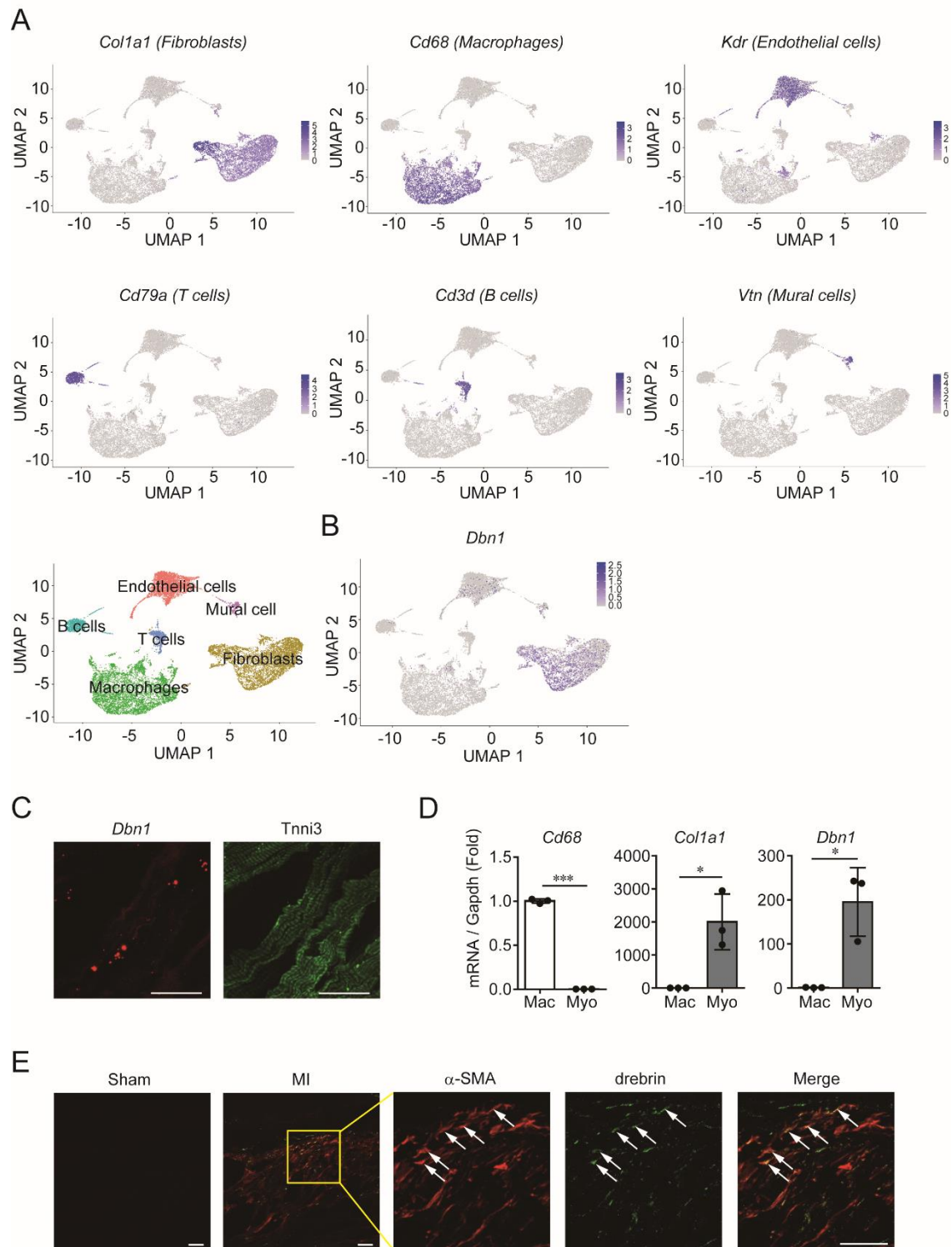


Figure 2. Drebrin is specifically expressed in myofibroblasts in mouse fibrotic hearts after MI.

(A) *Colla1*, *Cd68*, *Kdr*, *Cd79a*, *Cd3d* and *Vtn* mRNA expressions and UMAP plots in mouse cardiac interstitial cells 3 or 7 days after sham or MI. The publicly available data (E-MTAB-7376) were reanalyzed using R package Seurat.

(B) *Dbn1* mRNA expressions in mouse cardiac interstitial cells 3 or 7 days after sham or MI. The publicly available data (E-MTAB-7376) were reanalyzed using R package Seurat.

(C) *Dbn1* mRNA expression in mouse fibrotic hearts. The heart sections obtained 7 days after MI were subjected to *in situ* hybridization for *Dbn1* and immunohistochemistry with an anti-Tnni3 antibody. White arrows indicate the *Dbn1* signals. Scale bar: 20 μ m.

(D) *Dbn1* mRNA expression levels in macrophages (Mac) or myofibroblasts (Myo) isolated from mouse hearts 3 days after MI. Total RNA extracted from macrophages or myofibroblasts were subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, *P < 0.05. n = 3.

(E) The specific expression of drebrin in myofibroblasts in mouse hearts 7 days after MI. Heart slices collected from the mouse hearts were subjected to immunohistochemistry with antibodies against drebrin and α -SMA. White arrows indicate merged cells. Scale bar 20 μ m.

筋線維芽細胞の分化時における drebrin の発現誘導は TGF- β シグナル、MRTF-SRF シグナルにより媒介される

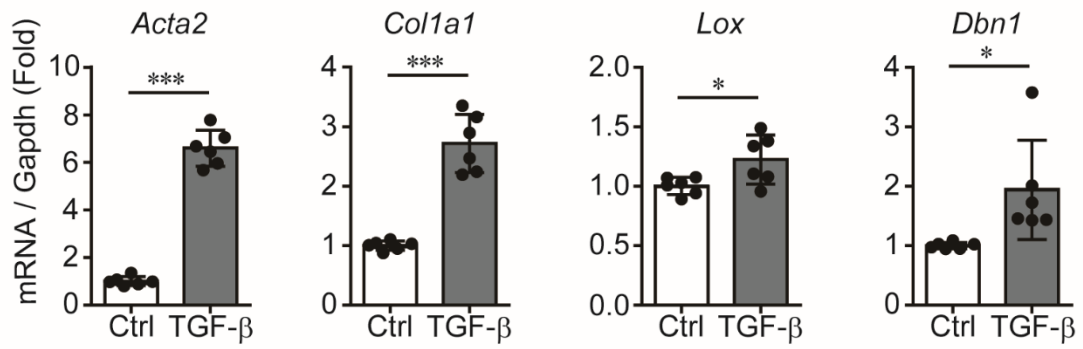
次に drebrin の発現誘導メカニズムを検討した。一般的に、常在性の線維芽細胞を含む様々な細胞から筋線維芽細胞へと分化する際に、最も重要とされているサイトカインは、炎症時に遊走される血球系細胞から放出される TGF- β である。drebrin は MI 後初期に発現上昇が認められることから(Fig. 1D)、drebrin の発現は TGF- β により誘導されるのではないかと考えた。そこで、マウス線維芽細胞である NIH3T3細胞に TGF- β 刺激を行い、発現量を比較した。その結果、*Acta2* (α SMA タンパク質をコード)、*Colla1*、*Lox* などの線維化関連因子の発現量が増加するのと同様に、drebrin (*Dbn1*)の発現量も有意に増加することが明らかになった(Fig. 3A)。この結果に一致して、単離した新生児ラット心臓の常在性の線維芽細胞に TGF- β 刺激を行っても、*Acta2*、*Dbn1* の発現増加が認められた(Fig. 3B)。

一般的に TGF- β は Smad3 の活性化や MRTF-SRF シグナルの活性化を介して、筋線維芽細胞の分化を促進することが知られている(33, 34)。そこで、心臓の筋線維芽細胞において、Smad3 や MRTF-SRF シグナルの活性化が *Dbn1* の発現誘導に関与するかを検討した。Smad3 の阻害剤である SIS3 あるいは MRTF-SRF シグナルの阻害剤である CCG-1423 を心臓の筋線維芽細胞に処置したところ、

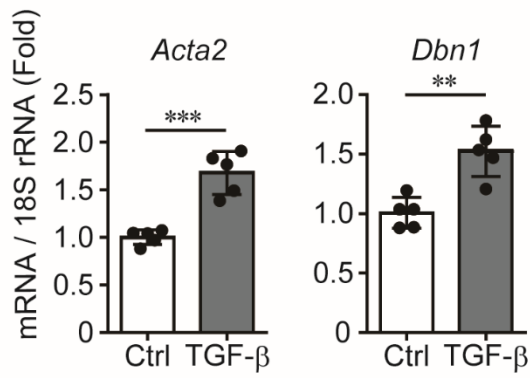
Acta2 の発現量が抑制されるのと同様に、*Dbn1* の発現量も有意に抑制されることが明らかになった(Fig. 3C)。

以上の結果から、筋線維芽細胞において、*drebrin* の発現は TGF- β シグナルやその下流の MRTF-SRF シグナルにより誘導されることが明らかになった。

A



B



C

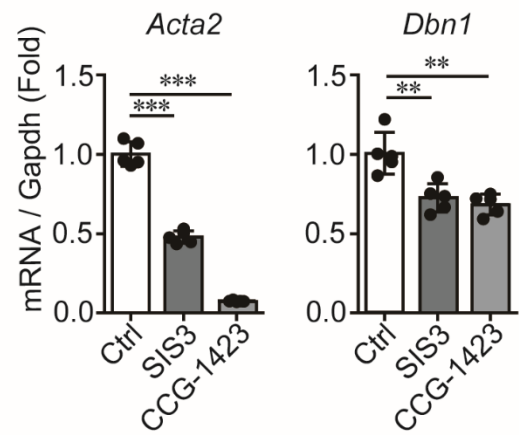


Figure 3. Drebrin induction during cardiac myofibroblasts differentiation is mediated by TGF- β signaling and MRTF-SRF signaling.

(A) *Acta2*, *Colla1*, *Lox*, and *Dbn1* mRNA expression levels in NIH3T3 cells after TGF- β (2 ng/mL) stimulation for 24 hr. Total RNA extracted from stimulated NIH3T3 cells was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, *P < 0.05. n = 6.

(B) *Acta2* and *Dbn1* mRNA expression levels in neonatal rat cardiac fibroblasts after TGF- β (10 ng/mL) stimulation for 72 hr. Total RNA extracted from the stimulated fibroblasts was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01. n = 5.

(C) *Acta2* and *Dbn1* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts after SIS3 (3 μ M) or CCG-1423 (10 μ M) treatment for 24 hr. Total RNA extracted from treated cardiac myofibroblasts were subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01. n = 5.

drebrin は筋線維芽細胞において線維化関連因子の産生を促進する

次に、drebrin が線維化に与える影響について解析を行った。線維化したマウス心臓から筋線維芽細胞を単離し、drebrin をノックダウンしたときの線維化関連因子の発現量を調べた。その結果、*Coll1a1*、*Col3a1*、*Coll4a1*、*Lox* といった線維化関連因子の発現量が有意に抑制されることが明らかになった(Fig. 4A)。このdrebrin ノックダウンによる線維化関連因子の発現抑制は、drebrin 内の違う配列を標的とする siRNA を用いても認められた(Fig. 4B)。これらの結果に一致して、drebrin (*Dbn1*)をノックダウンした筋線維芽細胞では、コラーゲンのタンパク質量も減少していた(Fig. 4C)。

以上の結果から、心臓の筋線維芽細胞において、drebrin は線維化関連因子の産生を促進することが明らかになった。

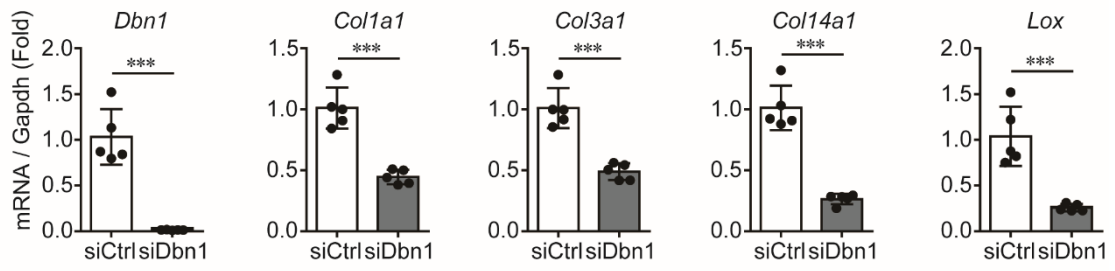
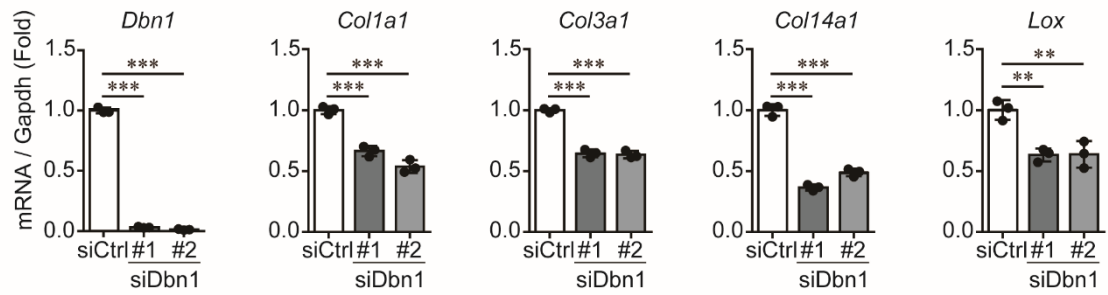
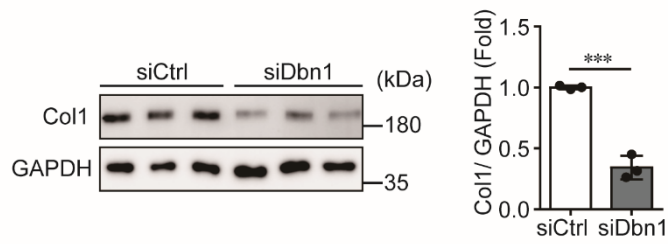
A**B****C**

Figure 4. Drebrin promotes the production of fibrosis-related genes in cardiac myofibroblasts.

(A) *Dbn1*, *Colla1*, *Col3a1*, *Coll4a1* and *Lox* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 5.

(B) *Dbn1*, *Colla1*, *Col3a1*, *Coll4a1* and *Lox* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl, siDbn1 (#1) or (#2). At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01; n = 3.

(C) Collagen1a1 (Col1) protein expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to immunoblot analysis. The right panel shows quantification of Collagen1a1 expression. ***P < 0.001; n = 3.

drebrin はアクチン骨格が発達した筋線維芽細胞に発現する

次に、drebrin の線維化促進メカニズムを解析するために、偽処置あるいは MI 処置後 3、7 日目の心臓から単離した筋線維芽細胞を含む線維芽細胞(Pdgfra+, Cd31-)の scRNA-Seq(E-MTAB-7376)の公開データを解析した。まず、線維芽細胞を drebrin 陰性(*Dbn1*-neg)、drebrin 陽性(*Dbn1*-pos)に分け、その 2 群間で発現が変動する分子をヒートマップで示した(Fig. 5A)。その中から、drebrin 陽性(*Dbn1*-pos)群に豊富な分子を Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)を用いて解析したところ、アクチン骨格形成に関与する分子が多く認められることが明らかになった(Fig. 5B)。実際に、筋線維芽細胞のアクチン骨格形成に関与する *Acta2*、*Tagln* の発現量は drebrin 陽性(*Dbn1*-pos)群に多く発現することを見出した(Fig. 5C)。筋線維芽細胞において、発達したアクチン骨格形成は自身の分化状態の維持と ECM 産生に重要な役割を果たすため、drebrin が筋線維芽細胞のアクチン骨格形成に寄与し、線維化を促進する可能性が考えられた。

さらに、この線維化時の drebrin とアクチン骨格形成分子の発現がヒト患者でも認められるかを調べた。心筋梗塞を含む虚血性心筋症(ICM:ischemic cardiomyopathy)患者の心臓 RNA を用いた RNA-Seq のデータ(GSE116250)を解析した結果、drebrin (*DBN1*)の発現量と *ACTA2*、*TAGLN* の発現量には正の相関があ

ることが明らかになった(Fig. 5D)。すなわち、drebrin はヒト患者においても筋線維芽細胞のアクチン骨格形成に関与している可能性が考えられた。

以上の結果から、drebrin はアクチン骨格の発達した筋線維芽細胞に発現することが明らかになった。

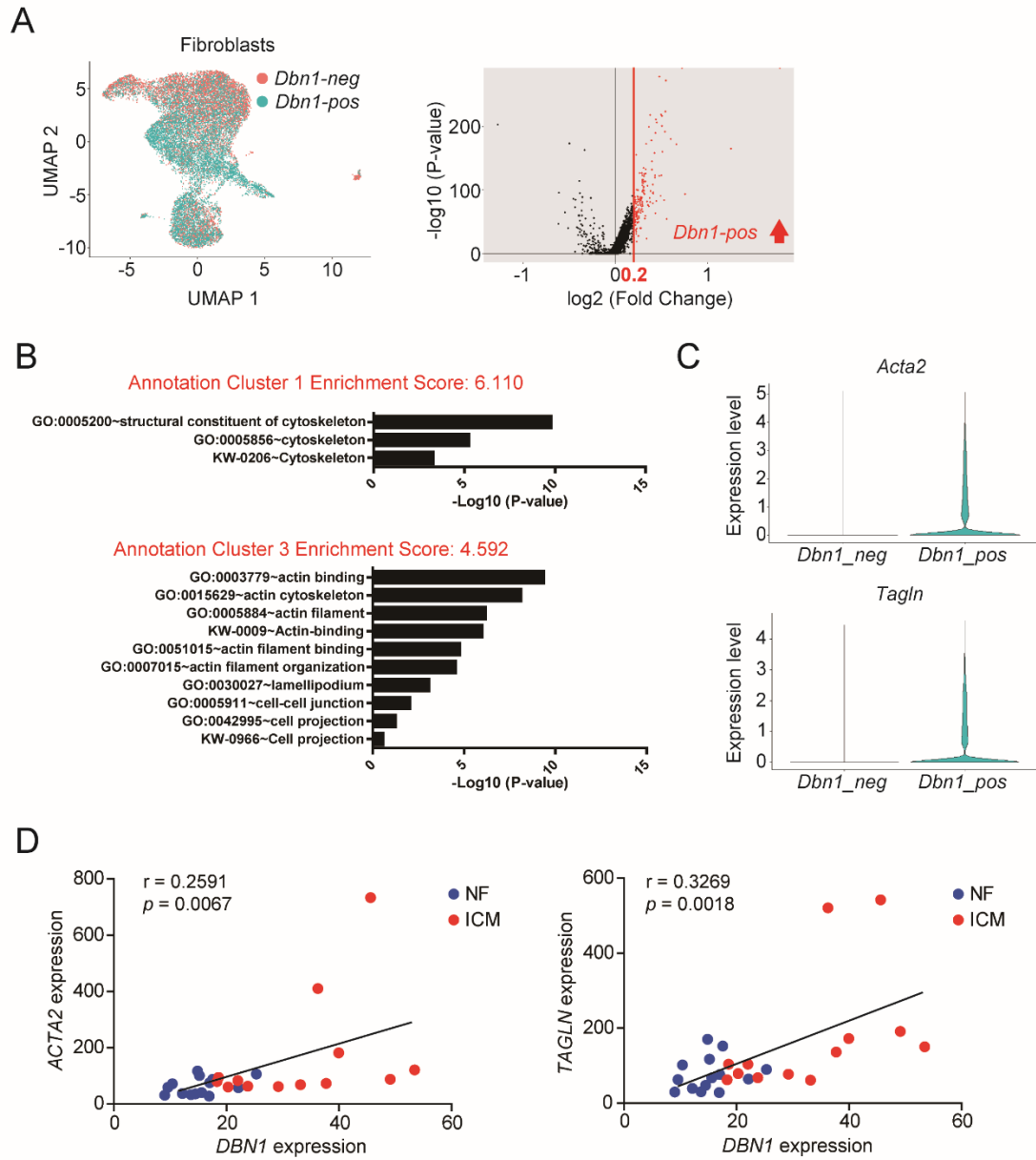


Figure 5. Drebrin is expressed in cardiac myofibroblasts with a well-developed actin cytoskeleton.

(A) Plot of *Dbn1*-positive (*Dbn1*-pos) or *Dbn1*-negative (*Dbn1*-neg) fibroblasts and volcano plot of genes differentially expressed between *Dbn1*-positive and *Dbn1*-negative fibroblasts. The publicly available data (E-MTAB-7376) were reanalyzed using the R package Seurat. The plots divided into *Dbn1*-pos and *Dbn1*-neg fibroblasts are shown in the left panel. The volcano plot of genes differentially expressed between *Dbn1*-pos and *Dbn1*-neg fibroblasts is shown in the right panel. The x-axis represents fold change between the two groups, and the y-axis represents the P-value. The red line represents 0.2-fold increase.

(B) Annotation cluster of genes differentially expressed between *Dbn1*-positive (*Dbn1*-pos) and *Dbn1*-negative (*Dbn1*-neg) fibroblasts. The differentially expressed genes were analyzed using DAVID; enriched annotation clusters are shown.

(C) *Acta2* and *Tagln* mRNA expression levels of *Dbn1*-positive (*Dbn1*-pos) and *Dbn1*-negative (*Dbn1*-neg) fibroblasts. The violin plots between *Dbn1*-pos and *Dbn1*-neg fibroblasts were drawn using the data reanalyzed in Fig. 5A.

(D) Relative *DBN1* and *ACTA2* or *TAGLN* mRNA expression in non-failing (NF) or ischemic (ICM) human hearts. The publicly available data (GSE116250) were reanalyzed. The x-axis represents *DBN1* expression, and the y-axis represents *ACTA2* (left panel) or *TAGLN* (right panel) expression. The blue and red plots indicate the NF and ICM human hearts, respectively. NF: n = 14; ICM: n = 13.

drebrin は心臓の筋線維芽細胞のアクチン骨格形成を促進する

drebrin はアクチン骨格の発達した筋線維芽細胞に発現することから、drebrin が実際に筋線維芽細胞のアクチン骨格形成に寄与している可能性を検討した。心臓の筋線維芽細胞を単離し、drebrin (*Dbn1*)をノックダウンし、RNA-Seq 解析を行った(Fig. 6A)。Dbn1 ノックダウンにより発現量が減少した分子で、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)解析を行ったところ、接着班やアクチン骨格制御などに関与する分子の発現減少が多く認められた(Fig. 6A, B)。実際に、アクチン骨格形成促進に寄与する *Acta2*、*Tagln* の Dbn1 ノックダウンによる発現抑制は、qRT-PCR によっても確認された(Fig. 6C)。この結果に一致して、*Acta2*、*Tagln* から翻訳される α -SMA、SM22 α のタンパク質量も心臓の筋線維芽細胞において、Dbn1 ノックダウンにより抑制された(Fig. 6D)。一方で、 α -SMA と同じアクチンタンパク質であり、すべての真核細胞にかなり豊富に存在する β -actin (*Actb*)は mRNA レベルでは有意な抑制が認められたが、そのタンパク質量は減少傾向が認められるものの、有意差はなかった (Fig. 6C, D)。

さらに、私は F-アクチンを染色するファロイジンを用いて、drebrin が心臓の筋線維芽細胞のアクチン骨格形成に与える影響について解析した。その結果、Dbn1 をノックダウンすることで、心臓の筋線維芽細胞の F-アクチン骨格形成が抑制されていることが明らかになった(Fig. 6E)。

以上の結果から、drebrin は心臓の筋線維芽細胞において、 α -SMA や SM22 α などのアクチン骨格形成に関与する遺伝子の発現を促進することを明らかにした。

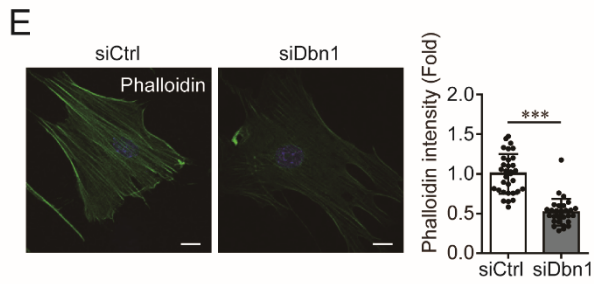
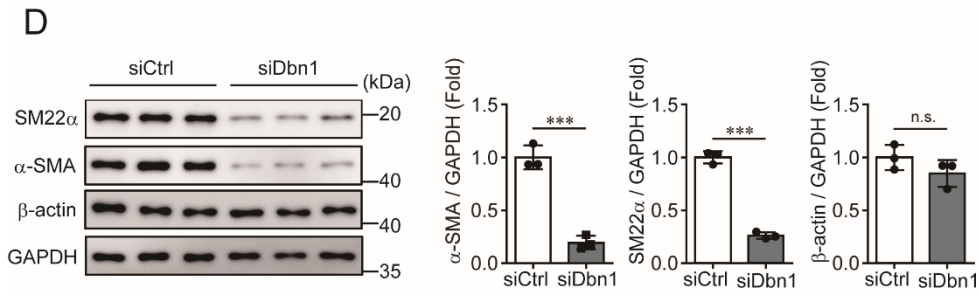
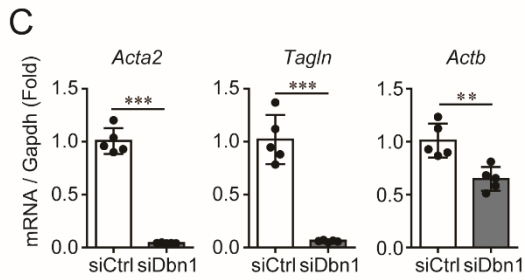
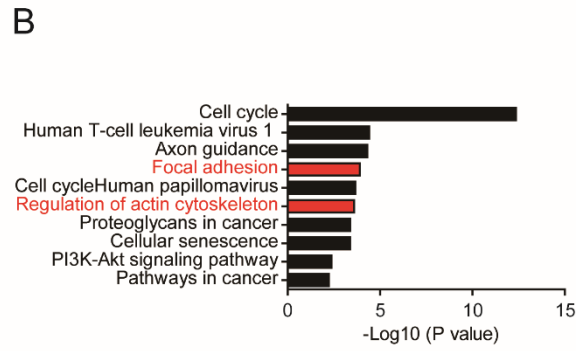
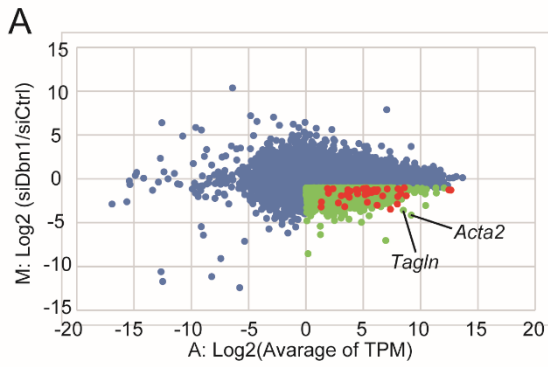


Figure 6. Drebrin promotes actin cytoskeleton formation in cardiac myofibroblasts.

(A) MA plot of genes differentially expressed between siCtrl and siDbn1 myofibroblasts.

At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to RNA-Seq, and the MA plots were drawn using the TPM values obtained. The x-axis represents the TPM value for gene expression, and the y-axis represents fold change between the two groups. The green plots indicate the genes downregulated on silencing *Dbn1* ($M < -1.0$, $A > 0$), and the red plots indicate the genes in GO terms associated with focal adhesion and regulation of the actin cytoskeleton.

(B) KEGG pathway enrichment analysis of genes differentially expressed between the two groups. The genes downregulated on silencing *Dbn1* ($M < -1.0$, $A > 0$) were analyzed using DAVID; the enriched KEGG pathways (gene count > 25) are shown.

(C) *Acta2*, *Tagln*, and *Actb* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to qRT-PCR. *** $P < 0.001$; $n = 5$.

(D) α -SMA, SM22 α or β -actin protein expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 60 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were starved for 12 hr, lysed, and subjected to immunoblot analysis. The right panel shows quantification of α -SMA and SM22 α expression. *** $P < 0.001$; $n = 3$.

(E) Phalloidin staining of F-actin in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 48 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were seeded onto glass-bottom dishes, cultured for 24 hr, and subjected to phalloidin staining. Scale bar: 20 μ m. The right panel shows quantification of phalloidin intensity. *** $P < 0.001$; siCtrl: $n = 32$; siDbn1: $n = 30$.

drebrin は MRTF-SRF シグナルを促進する

MRTF-SRF シグナルは、筋線維芽細胞の分化や *Acta2* の転写に関わる重要なシグナルであることが知られている。そこで、私は drebrin が MRTF-SRF シグナルの活性化に寄与するかについて検討した。マウス線維芽細胞株である NIH3T3 細胞に drebrin を過剰発現し、MRTF-SRF シグナルを特異的に検出する SRF-RE Luc を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、drebrin を過剰発現することで、MRTF-SRF シグナルの促進が認められ、さらにこの促進効果は MRTF-SRF シグナルの阻害剤である CCG-1423 処置により、抑制された(Fig. 7A)。

NIH3T3 細胞は TGF- β 刺激による SRF 活性化を介して、筋線維芽細胞様の性質を獲得することが報告されている(35)。そこで、私は drebrin がこの NIH3T3 細胞の TGF- β /MRTF-SRF を介した筋線維芽細胞様の細胞への分化に関与するかについて検討を行った。SRF-RE Luc を用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TGF- β 刺激により MRTF-SRF シグナルが活性化し、その活性は Dbn1 ノックダウンにより抑制された(Fig. 7B)。この結果に一致して、NIH3T3 細胞においても TGF- β 刺激により発現増加する *Acta2*、*Coll1a1* が Dbn1 ノックダウンにより抑制されることを見出した(Fig. 7C)。

転写共役因子 MRTF は通常時、細胞質に存在し、G-アクチンと結合している。ところが、G-アクチンが重合して F-アクチンになると、MRTF は G-アクチンか

ら乖離し、核移行して *Acta2*、コラーゲンなどの転写を促進する。そこで私は MRTF と 2 種のアクチン、 α -SMA (smooth muscle actin) あるいは β -actin (cytoplasmic actin) との結合に、アクチン結合タンパク質である drebrin が及ぼす影響を免疫沈降法により解析した。その結果、MRTF と結合する α -SMA あるいは β -actin の量が drebrin の過剰発現により減少することを見出した (Fig. 7D)。さらに、心臓の筋線維芽細胞において、*Dbn1* をノックダウンすると、MRTF の核移行が抑制されることも明らかにした (Fig. 7E, F)。一方で、MRTF (*Mkl1*, *Mkl2*) の発現量は *Dbn1* のノックダウンによって抑制されなかった (Fig. 7G)。

以上の結果から、drebrin はアクチン重合を制御することで、MRTF-SRF シグナルを促進することを明らかにした。

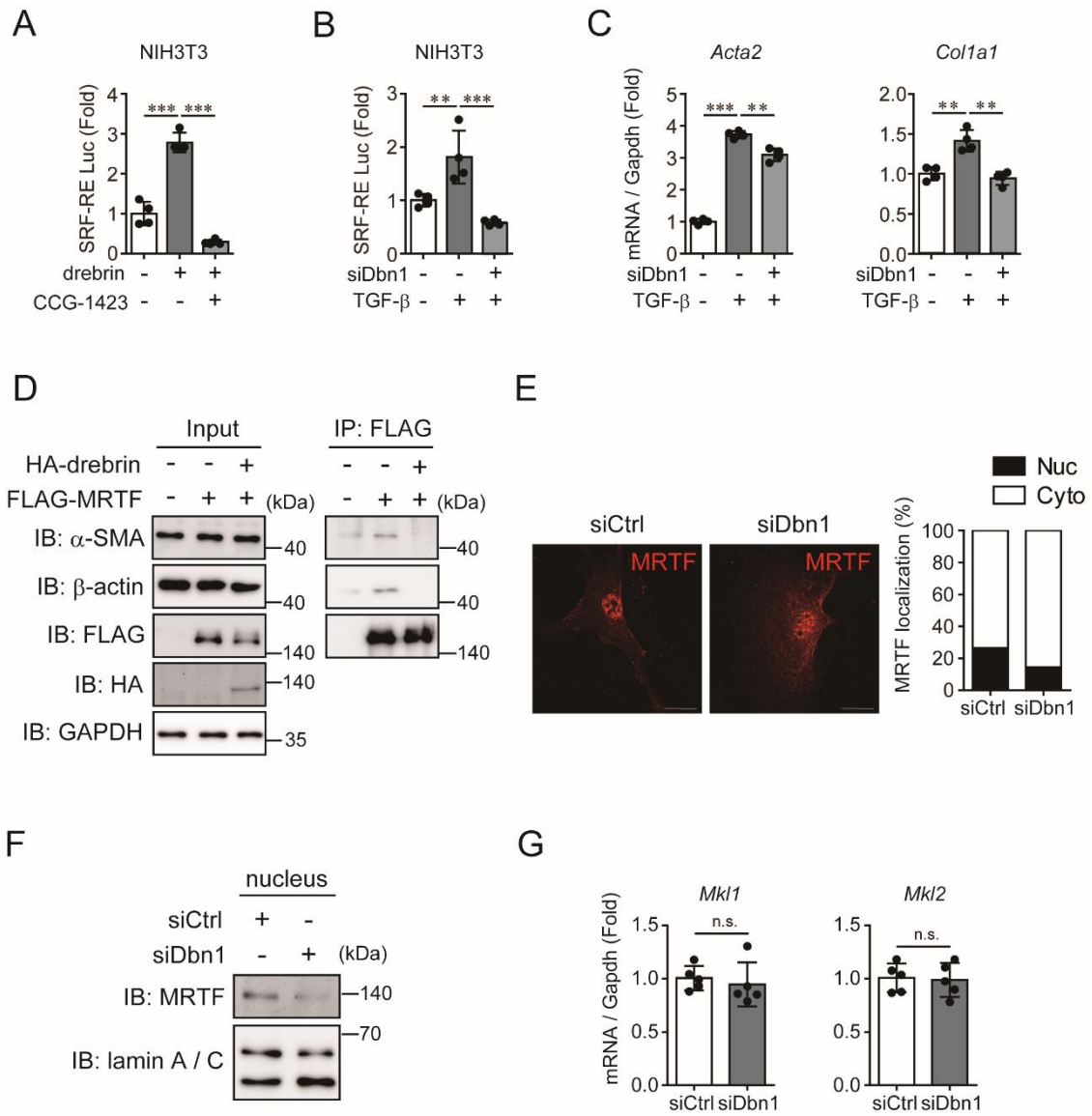


Figure 7. Drebrin promotes MRTF-SRF signaling.

(A) Luminescence obtained using the SRF-RE reporter in drebrin-overexpressing NIH3T3 cells after CCG-1423 treatment. At 24 hr after plasmid transfection, the NIH3T3 cells were starved for 24 hr, treated with CCG-1423 (10 μ M) for 24 hr, lysed, and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 4.

(B) Luminescence obtained using the SRF-RE reporter in Dbn1-knockdown NIH3T3 cells after TGF- β stimulation. At 48 hr after siRNA transfection, the NIH3T3 cells were stimulated with TGF- β (2 ng/ml) for 24 hr, lysed, and subjected to the luciferase assay. ***P < 0.001, **P < 0.01; n = 4.

(C) *Acta2* and *Coll1a1* mRNA expression levels in NIH3T3 cells treated with siCtrl or siDbn1 after TGF- β stimulation. At 48 hr after siRNA transfection, the NIH3T3 cells were stimulated with TGF- β (2 ng/ml) for 24 hr, lysed, and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01; n = 4.

(D) Binding between MRTF and α -SMA or β -actin in drebrin-overexpressing NIH3T3 cells. At 48 hr after plasmid transfection, the NIH3T3 cells were lysed and subjected to the immunoprecipitation assay.

(E) MRTF localization in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 48 hr after siRNA transfection, the cells were seeded onto glass-bottom dishes, cultured for 24 hr, and subjected to immunocytochemistry. The right panel shows quantification of MRTF intensity.

(F) MRTF protein expression levels in the nucleus of cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 48 hr after siRNA transfection, the proteins in nucleus of the cells were extracted and subjected to immunoblot analysis.

(G) *Mkl1* and *Mkl2* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to qRT-PCR. n.s., not significant; n = 5.

drebrin は MRTF-SRF シグナルを介して Cthrc1 の発現を促進する

私は drebrin が MRTF-SRF シグナルを介して、筋線維芽細胞の分化を制御することを見出した。そこで、私は次に drebrin によって、発現量が制御される線維化促進分子を同定しようと考えた。scRNA-Seq(Fig. 5A)のデータを再解析したところ、分泌タンパク質 Cthrc1 の発現が drebrin 陽性細胞に特異的に認められることを見出した(Fig. 8A)。この結果に一致して、線維化を伴うヒト虚血性心筋症(ICM:ischemic cardiomyopathy)患者の心臓においても、*CTHRC1* の発現量が増加した(Fig. 8B)。さらに、心臓の筋線維芽細胞において drebrin (*Dbn1*)をノックダウンした RNA-Seq(Fig. 6A)のデータを再解析したところ、Cthrc1 の発現量は Dbn1 ノックダウンにより、抑制されていた(Fig. 8C)。この心臓の筋線維芽細胞における Dbn1 ノックダウンによる Cthrc1 の発現抑制は、qRT-PCR でも確認できた(Fig. 8D)。

Cthrc1 は近年、コラーゲンなどの線維化関連因子の産生に寄与することや、scRNA-Seq 解析により筋線維芽細胞の新たなマーカータンパク質となる可能性が報告されている(28, 36)。実際に、Cthrc1 をノックダウンした心臓の筋線維芽細胞を用いた qRT-PCR とウエスタンブロッティングの結果から、Cthrc1 が心臓の筋線維芽細胞において、線維化関連因子の産生に寄与することが確認できた(Fig. 8E, F)。

drebrin は F-アクチンの安定化を担うことが知られているため、私は drebrin による F-アクチンの安定化が *Cthrc1* の発現制御に重要である可能性を考えた。

Rho-associated protein kinase(ROCK)は Lin11, Isl-1 and Mec-3 kinase (LIMK)の活性化を介して、Cofilin による F-アクチンの脱重合を不活性化することで、F-アクチンの安定化に寄与することが知られている(37)。心臓の筋線維芽細胞に ROCK 阻害剤である Y27632 を処置したところ、*Cthrc1* の発現量は有意に抑制され(Fig. 8G)、F-アクチンの安定化が *Cthrc1* の発現量に重要であることが示唆された。

drebrin が MRTF-SRF シグナルを促進することを考慮すると、*Cthrc1* の発現量は MRTF-SRF シグナルに依存するのではないかと考えた。そこで、心臓の筋線維芽細胞に、MRTF-SRF シグナルの阻害剤である CCG-1423 を処置あるいは SRF をノックダウンし、*Cthrc1* の発現量を調べた。その結果、CCG-1423、SRF のノックダウンいずれにおいても、*Cthrc1* の発現量は抑制された(Fig. 8H, I)。

以上の結果から、心臓の筋線維芽細胞において、drebrin による F-アクチンの安定化が、MRTF-SRF シグナルを介して *Cthrc1* の発現量を促進することが明らかになった。

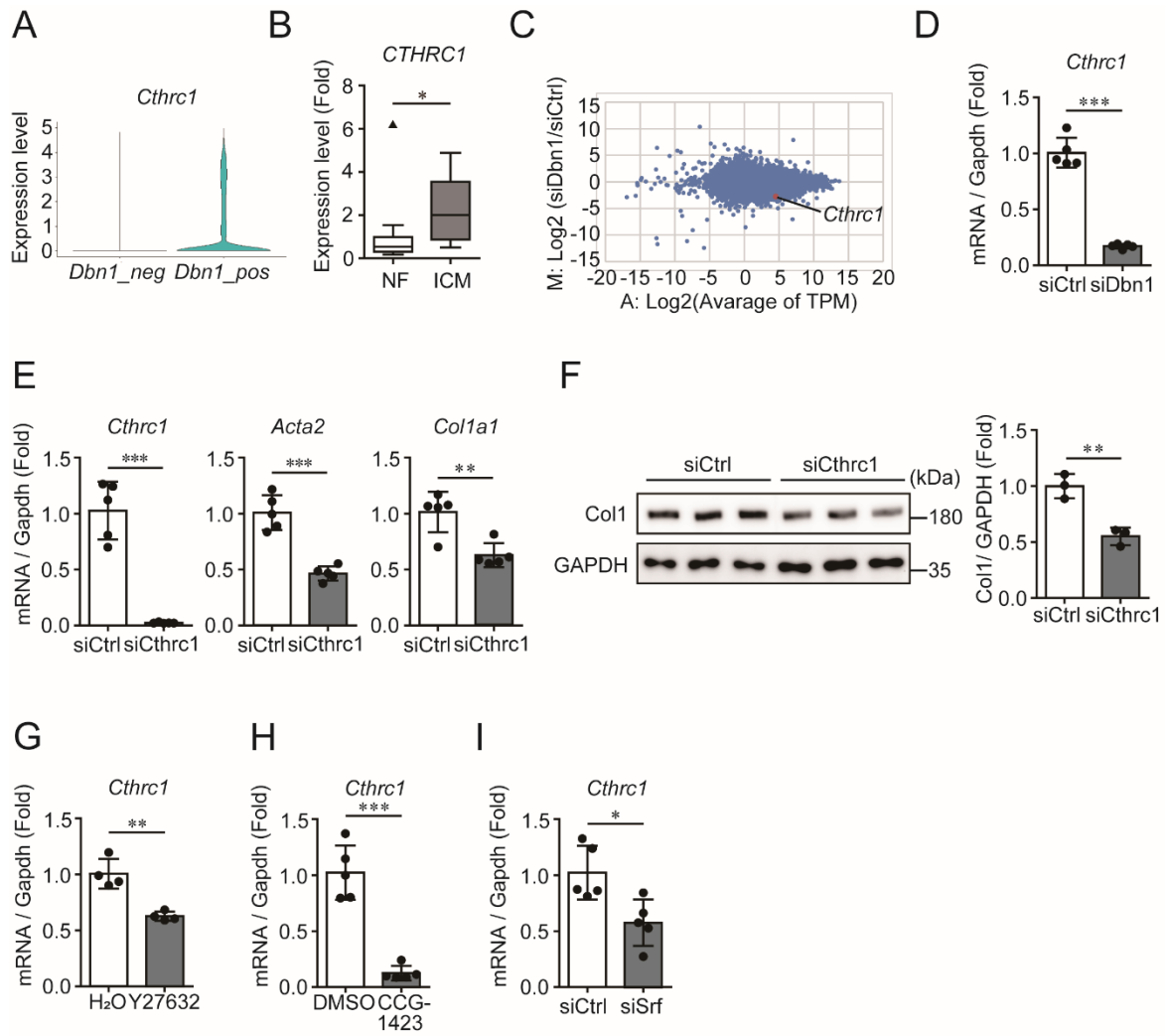


Figure 8. Drebrin promotes the *Cthrc1* expression via MRTF-SRF signaling in cardiac myofibroblasts.

(A) *Cthrc1* mRNA expression levels of *Dbn1*-positive (*Dbn1*-pos) and *Dbn1*-negative (*Dbn1*-neg) fibroblasts. The violin plots between *Dbn1*-positive and *Dbn1*-negative fibroblasts were drawn by using the data reanalyzed in Fig. 5A.

(B) *CTHRC1* mRNA expression levels in non-failing (NF) or ischemic (ICM) human hearts. The publicly available data (GSE116250) were reanalyzed. Data are presented as the box and whisker plot (tukey style, outliers in black triangles). * $P < 0.05$; NF: $n = 14$; ICM: $n = 13$.

(C) MA plot of genes differentially expressed between siCtrl and siDbn1 myofibroblasts. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to RNA-Seq, and MA plots were drawn using the TPM values obtained. The x-axis represents the TPM value for gene expression, and the y-axis represents fold change between the two groups.

(D) *Cthrc1* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to qRT-PCR. *** $P < 0.001$; $n = 5$.

(E) *Cthrc1*, *Acta2* and *Colla1* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siCthrc1. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to qRT-PCR. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; $n = 5$.

(F) Collagen1a1 (Col1) protein expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siCthrc1. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to immunoblot analysis. The right panel shows quantification of Collagen1a1 expression. ** $P < 0.01$; $n = 3$.

(G) *Cthrc1* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with H₂O or Y27632. Cardiac myofibroblasts were treated with Y27632 (30 μM) for 24 hr, lysed, and subjected to qRT-PCR. **P < 0.01; n = 4.

(H) *Cthrc1* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with DMSO or CCG-1423. Cardiac myofibroblasts were starved for 24 hr, treated with CCG-1423 (10 μM) for 24 hr, lysed, and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 5.

(I) *Cthrc1* mRNA expression levels in cardiac myofibroblasts treated with siCtrl or siSrf. At 72 hr after siRNA transfection, the cardiac myofibroblasts were lysed and subjected to qRT-PCR. *P < 0.05; n = 5.

drebrin は肺においても線維化時に TGF- β シグナルや MRTF-SRF シグナルにより発現増加する

次に、私は drebrin が心臓以外の組織線維化に寄与するかについて検討を行った。特発性肺線維症は肺の線維化を伴う慢性的な進行性疾患で、その診断からの平均余命は 2 - 4 年とされている(38)。そこで、私は drebrin が肺の線維化に関与するかを調べた。ブレオマイシンは肺の気管支に投与することで、肺の線維化を誘発するため、肺の線維化モデルマウスとして広く用いられている(39)。そこでこの肺線維化モデルマウスを作製したところ、*Coll1a1*、*Acta2* などの線維化関連因子と同様に、drebrin (*Dbn1*)の発現量もブレオマイシン投与により増加していた(Fig. 9A)。実際に、特発性肺線維症(IPF: idiopathic pulmonary fibrosis)患者の肺 RNA を用いた RNA-Seq(GSE92592)(40)のデータを解析したところ、*DBN1* の発現量は特発性肺線維症の肺で、有意に増加していることが明らかになった(Fig. 9B)。

次に、私は線維化した肺における drebrin (*Dbn1*)の発現細胞の同定に取り組んだ。その結果、*Dbn1* の発現は線維化した肺から単離したマクロファージではなく、筋線維芽細胞に認められることを見出した(Fig. 9C)。線維化したマウス肺切片の免疫組織染色からも、drebrin のシグナルは α -SMA 陽性の筋線維芽細胞に認められた(Fig. 9D)。

また、肺の筋線維芽細胞における *Dbn1* の発現誘導メカニズムについても解析した。線維化した肺から単離した筋線維芽細胞に、SIS3 あるいは CCG-1423 を処置した結果、心臓の筋線維芽細胞の時と同様に、*Acta2* および *Dbn1* の発現量が抑制された(Fig. 9E)。

以上の結果から、*drebrin* は肺においても線維化時に発現増加し、さらにその発現は TGF- β シグナル、MRTF-SRF シグナルにより誘導されることが明らかになった。

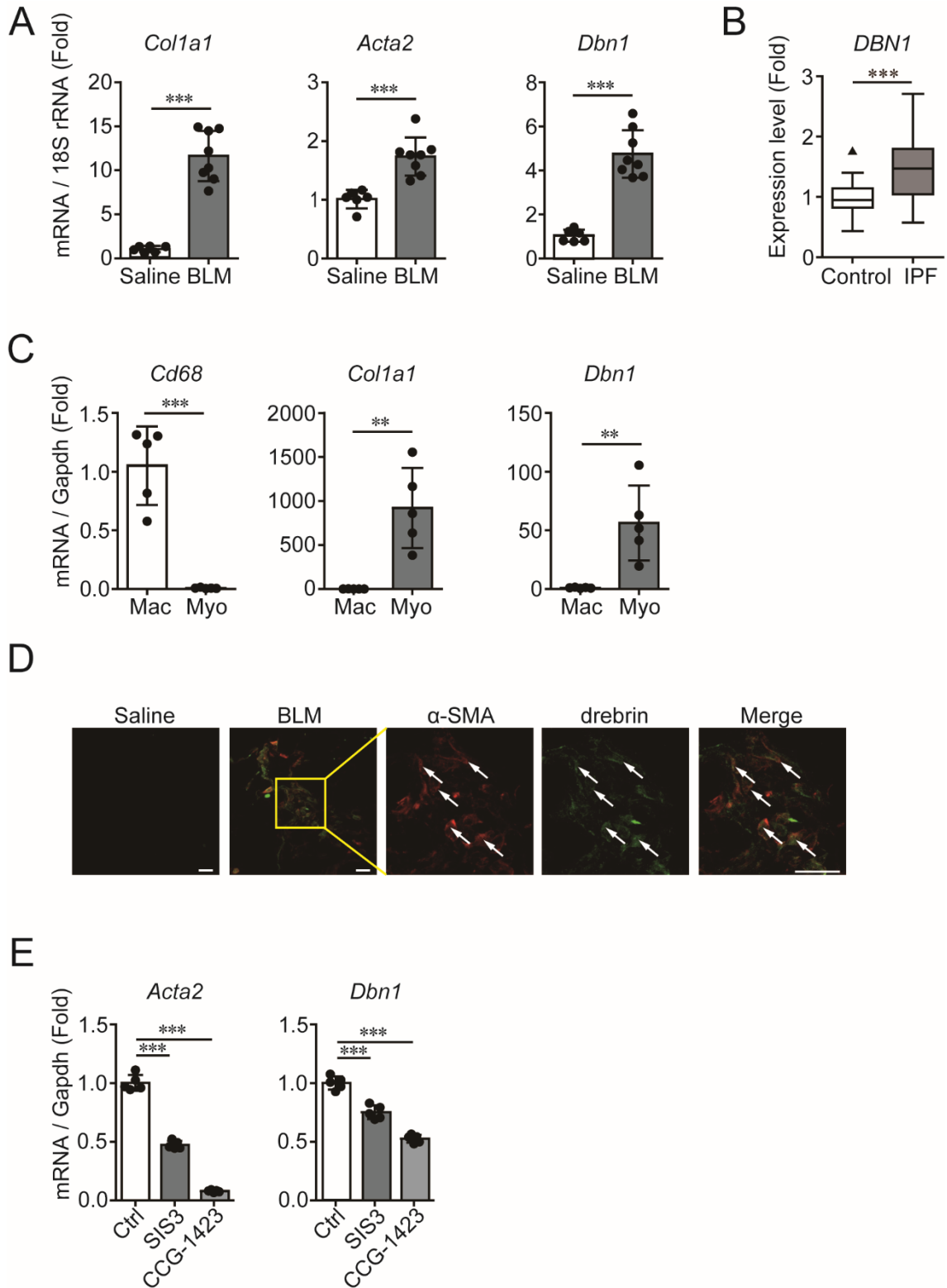


Figure 9. Drebrin expression is increased in fibrotic lung and its expression is dependent on TGF- β and MRTF-SRF signaling.

(A) *Coll1a1*, *Acta2*, and *Dbn1* mRNA expression levels in mouse lungs at 14 days after bleomycin administration. Total RNA extracted from mouse lungs was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001. Saline: n = 6, BLM: n = 8.

(B) *DBN1* mRNA expression levels in the control lungs and the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients using data from GSE92592. Data are presented as the box and whisker plot (tukey style, outliers in black triangles). ***P < 0.001. n = 19 (Control), n = 20 (IPF).

(C) *Cd68*, *Coll1a1*, and *Dbn1* mRNA expression levels in macrophages (Mac) or myofibroblasts (Myo) isolated from mouse lungs at 14 days after bleomycin administration. Total RNA extracted from macrophages or myofibroblasts was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01. n = 5.

(D) The specific expression of drebrin in myofibroblasts in mouse lungs 14 days after bleomycin administration. Lung slices collected from the mouse lungs were subjected to immunohistochemistry with antibodies against drebrin and α -SMA. White arrows indicate merged cells. Scale bar 20 μ m.

(E) *Acta2*, *Dbn1* mRNA expression levels in lung myofibroblasts after SIS3 (3 μ M) or CCG-1423 (10 μ M) treatment for 24 hr. Total RNA extracted from lung myofibroblasts was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001. n = 5.

drebrin は肺の筋線維芽細胞においても、アクチン骨格形成に関与し、**Cthrc1** の発現を介して線維化関連因子の産生を促進する

肺の筋線維芽細胞における **drebrin** の機能を解明するために、肺の筋線維芽細胞において **drebrin (Dbn1)** をノックダウンし、線維化関連因子の発現量を調べた。その結果、*Colla1*、*Col3a1*、*Coll4a1*、*Lox* などの線維化関連因子の発現量が有意に抑制された(Fig. 10A)。

また、**drebrin** をノックダウンした肺の筋線維芽細胞においては、アクチン骨格形成に寄与する分子 *Acta2*、*Tagln* の発現量も顕著に抑制されていた(Fig. 10B)。

drebrin が肺の筋線維芽細胞においてもアクチン骨格形成に寄与することから、線維化促進分泌タンパク質 **Cthrc1** の発現量も同様に促進するののかについて検討した。**Cthrc1** はマウス、ヒト患者の肺の線維化時に発現が増加することが、これまでに報告されている(29)。実際に、**Cthrc1** の発現量はブレオマイシンを投与したマウスの肺と IPF 患者の肺において、増加することが確認された(Fig. 10C, D)。さらに、心臓の結果に一致して、筋線維芽細胞において **Cthrc1** をノックダウンすると、線維化関連因子の発現量が抑制された(Fig. 10E)。

次に、**Cthrc1** の線維化時の発現増加に **drebrin** が関与しているかを調べるため、**Dbn1** をノックダウンした肺の筋線維芽細胞における **Cthrc1** の発現量を調べた。その結果、**Cthrc1** の発現量は **Dbn1** ノックダウンにより、顕著に抑制された(Fig.

10F)。また、Cthrc1 の発現量は心臓の筋線維芽細胞と同様に、MRTF-SRF シグナルの阻害剤である CCG-1423 処置により、顕著に抑制された(Fig. 10G)。

以上の結果から、drebrin は肺の筋線維芽細胞のアクチン骨格形成を促進することで、Cthrc1 や線維化関連因子の発現を増加させることが明らかになった。

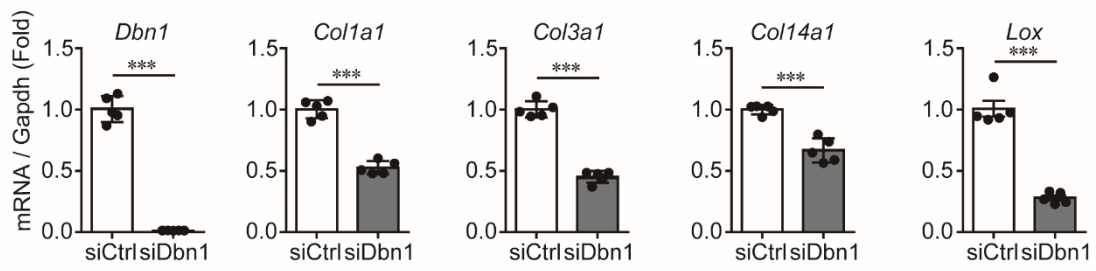
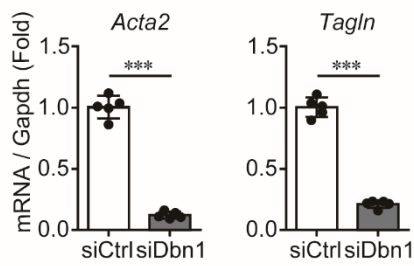
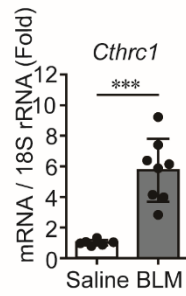
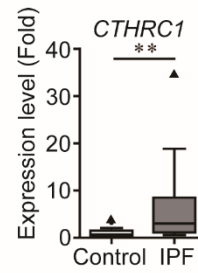
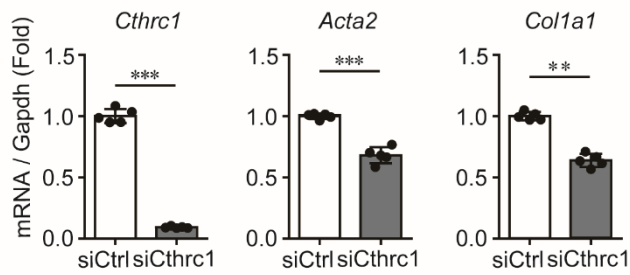
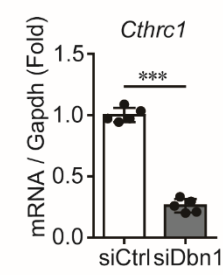
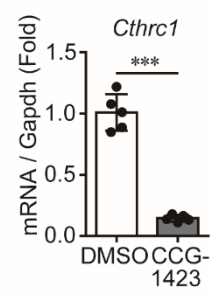
A**B****C****D****E****F****G**

Figure 10. Drebrin promotes the expression of fibrosis-related genes and *Cthrc1* in lung myofibroblasts.

(A) *Dbn1*, *Colla1*, *Col3a1*, *Coll4a1* and *Lox* in lung myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. Total RNA of the cells was harvested 72 hr after the siRNA transfection and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001. n = 5.

(B) *Acta2*, *Tagln* mRNA expression levels in lung myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. Total RNA of the cells was harvested 72 hr after the siRNA transfection and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001. n = 5.

(C) *Cthrc1* mRNA expression levels in mouse lungs at 14 days after bleomycin administration. Total RNA extracted from mouse lungs was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001. Saline: n = 6, BLM: n = 8.

(D) *CTHRC1* expression levels in the control lungs and the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients using data from GSE92592. Data are presented as the box and whisker plot (tukey style, outliers in black triangles). **P < 0.01. n = 19 (Control), n = 20 (IPF).

(E) *Cthrc1*, *Acta2* and *Colla1* mRNA expression levels in lung myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. Total RNA of the cells was harvested 72 hr after the siRNA transfection and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001. n = 5.

(F) *Cthrc1* mRNA expression level in lung myofibroblasts treated with siCtrl or siDbn1. Total RNA of the cells was harvested 72 hr after the siRNA transfection and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001. n = 5.

(G) *Cthrc1* mRNA expression levels in lung myofibroblasts treated with DMSO or CCG-1423. Lung myofibroblasts were starved for 24 hr, treated with CCG-1423 (10 μ M) for 24 hr, lysed, and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 5.

drebrin は肝臓の線維化時にも筋線維芽細胞(活性化肝星細胞)で発現増加する

次に、私は drebrin が肝臓の線維化にも関与するのかについて検討を行った。四塩化炭素(CCl₄)はマウス腹腔内に繰り返し投与すると肝細胞が障害され、その結果肝臓の線維化につながる(41)。従って、四塩化炭素投与は肝臓の線維化モデルマウスとして広く用いられている。そこで、この四塩化炭素投与による肝臓の線維化モデルマウスを作製したところ、*Colla1* や *Col3a1* などの線維化関連因子と共に、drebrin (*Dbn1*)の発現量も増加した (Fig. 11A)。

現在、肝臓の主たる線維化疾患として知られているのは、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)である。そこで次に、私は drebrin が NASH 時の肝臓線維化にも関与するのかを調べた。NASH モデルマウスは、超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD) の給餌により作成した(42)。CDAHFD を 3、6、9、12 週給餌した結果、*Colla1* や *Col3a1* の発現と同様に、*Dbn1* の発現量も線維化に伴って増加することが明らかとなった(Fig. 11B)。肝臓の線維化はその線維化の進行度により、F0-F4 に分類されることが知られている(43)。実際に、NASH 患者の肝臓 RNA を用いた RNA-Seq(GSE162694)(44)データを解析したところ、*DBN1* の発現量は線維化の進んだヒト患者(F4)の肝臓で大きく増加していた (Fig. 11C)。

線維化した肝臓切片を用いた高感度 *In situ* hybridization 法を行ったところ、*Dbn1* のシグナルは Desmin 陽性の細胞に認められ(Fig. 11D)、drebrin が肝臓の線

維化時においても、主たるコラーゲン産生細胞である活性化肝星細胞(HSC: hepatic stellate cell)に発現する可能性が考えられた。

次に、線維化した肝臓における drebrin 陽性細胞の特徴を調べるため、コーン油あるいは CCl₄ 投与した肝臓の scRNA-Seq(GSE171904)(45)のデータを解析した。肝星細胞のクラスターを *Dbn1* 陽性、*Dbn1* 陰性の 2 群に分け(Fig. 11E)、遺伝子の発現量を比較した結果、*Dbn1* 陽性の肝星細胞において、*Acta2*、*Tagln* などのアクチン骨格形成を担う遺伝子の発現が増加していることが明らかになった(Fig. 11F)。

以上の結果から、drebrin は肝臓の線維化時にも、筋線維芽細胞(活性化肝星細胞)に発現することが明らかになった。

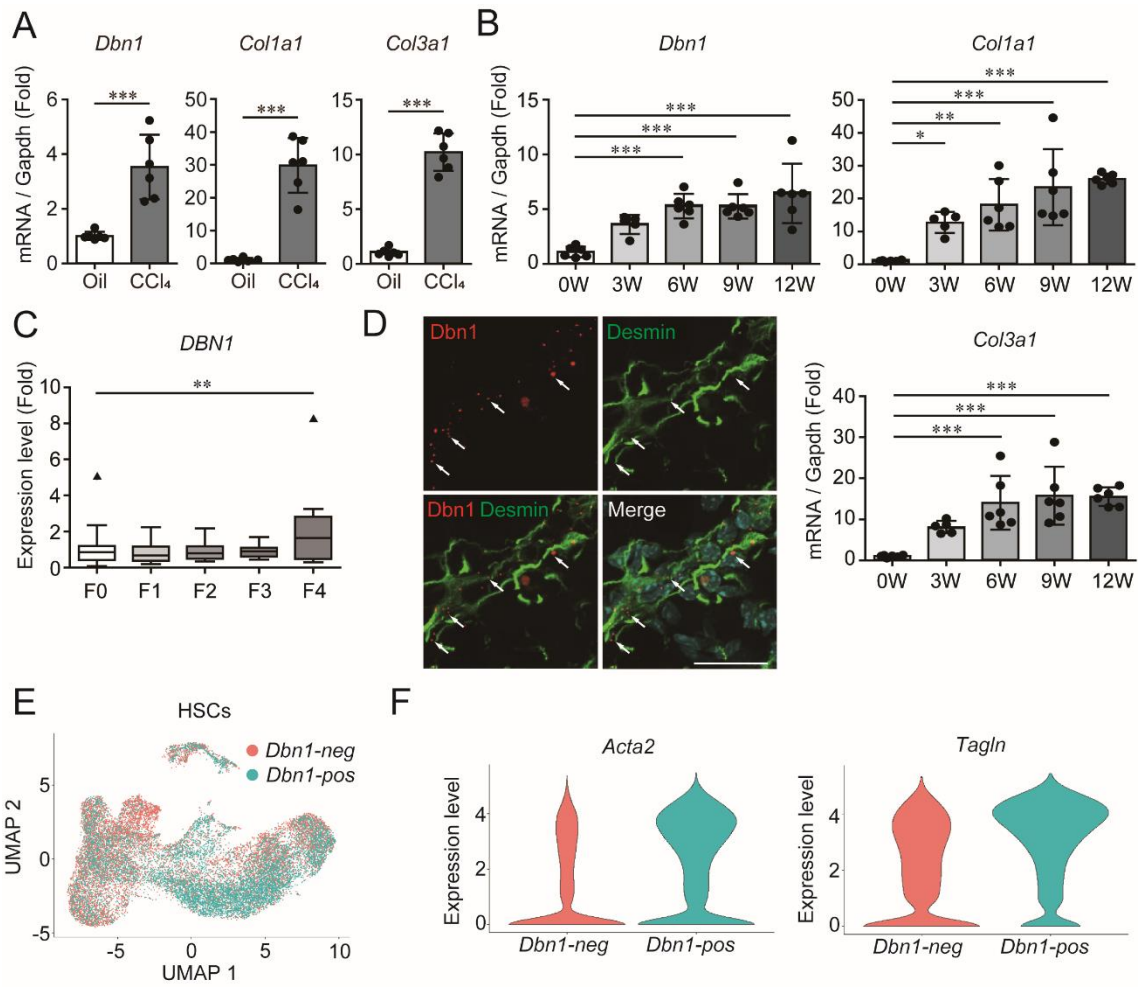


Figure 11. Drebrin is expressed in activated hepatic stellate cells in fibrotic liver.

(A) *Dbn1*, *Coll1a1*, and *Col3a1* mRNA expression levels in the livers of mice injected with CCl₄ for 4 weeks. Total RNA extracted from the mouse livers was used for qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 6.

(B) *Dbn1*, *Coll1a1*, and *Col3a1* mRNA expression levels in the livers of mice fed a CDAHFD for 0, 3, 6, 9, or 12 weeks. Total RNA extracted from the mouse livers was used for qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05; 0, 6, 9, and 12 weeks: n = 6; 3 weeks: n = 5.

(C) *DBN1* mRNA expression levels in patients with various stages (F0–F4) of hepatic fibrosis. The publicly available data (GSE162694) were reanalyzed. Data are presented as the box and whisker plot (tukey style, outliers in black triangles). **P < 0.01; F0: n = 35; F1: n = 30; F2: n = 27; F3: n = 8; F4: n = 12.

(D) *Dbn1* mRNA expression in mouse fibrotic livers. Liver sections from mice fed a CDAHFD for 10 weeks were subjected to *in situ* hybridization and immunohistochemistry with an anti-Desmin antibody. White arrows indicate the *Dbn1* signals. Scale bar: 20 μm.

(E) Plot of *Dbn1*-positive (*Dbn1*-pos) or *Dbn1*-negative (*Dbn1*-neg) HSCs and volcano plot of genes differentially expressed between *Dbn1*-pos and *Dbn1*-neg HSCs. The publicly available data (GSE171904) were reanalyzed using the R package Seurat, and the plots divided into *Dbn1*-pos and *Dbn1*-neg HSCs are shown.

(F) *Acta2* and *Tagln* mRNA expression levels of *Dbn1*-positive (*Dbn1*-pos) and *Dbn1*-negative (*Dbn1*-neg) HSCs. The violin plots between *Dbn1*-pos and *Dbn1*-neg HSCs were drawn using the data reanalyzed in Fig. 11E.

drebrin は肝臓の筋線維芽細胞(活性化肝星細胞)においてもアクチン骨格形成を介して線維化関連因子の産生を促進する

次に、私は活性化肝星細胞においても、**drebrin** が線維化関連因子の産生を促進するかについて検討した。CCl₄あるいはCDAHFDを投与することで線維化を誘導した肝臓から単離した活性化肝星細胞において、**drebrin** (*Dbn1*)をノックダウンすると、*Colla1* などの線維化関連因子が有意に抑制されることが明らかになった(Fig. 12A, B)。

そこでさらに、**drebrin** が活性化肝星細胞においてもアクチン骨格形成を促進しているのかを調べた。その結果、*Dbn1* をノックダウンした活性化肝星細胞では *Acta2*、*Tagln* のアクチン骨格形成因子の発現量が抑制されており(Fig. 12C, D)、**drebrin** が活性化肝星細胞においてもアクチン骨格形成を促進していることが示唆された。

Dbn1 ノックダウンによる線維化関連因子とアクチン骨格形成因子の抑制は、ヒト肝星細胞株である LX-2 細胞においても同様に認められた(Fig. 12E)。

以上の結果から、**drebrin** は活性化肝星細胞においても、アクチン骨格形成を介して、線維化関連因子の産生を担っていることが明らかになった。

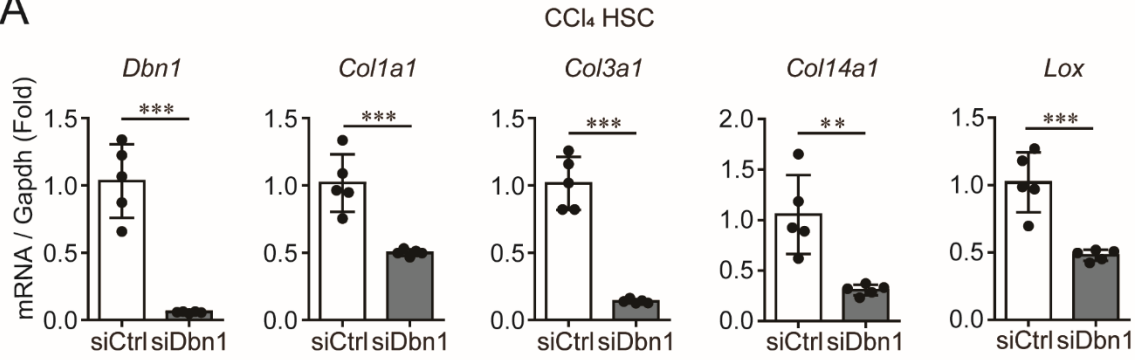
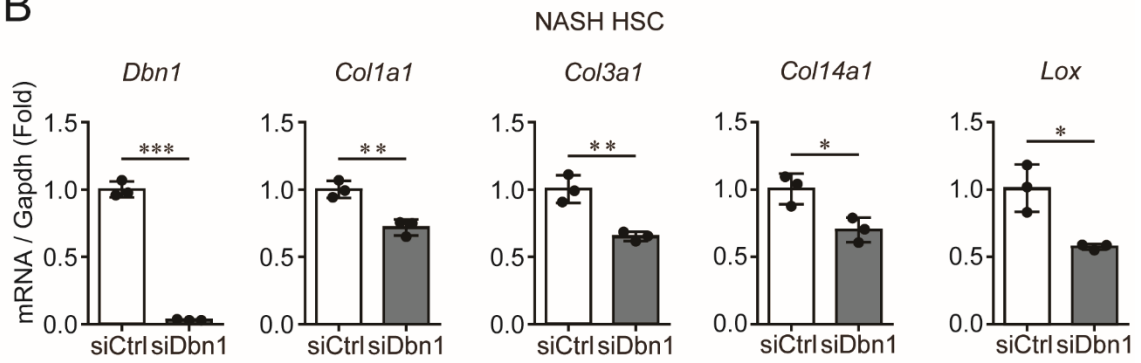
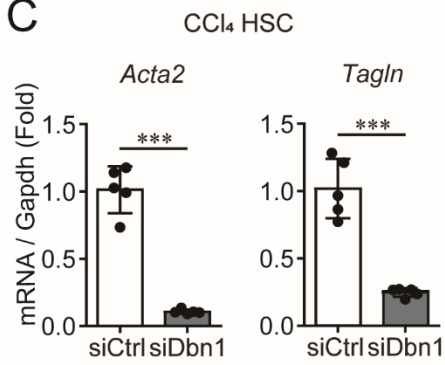
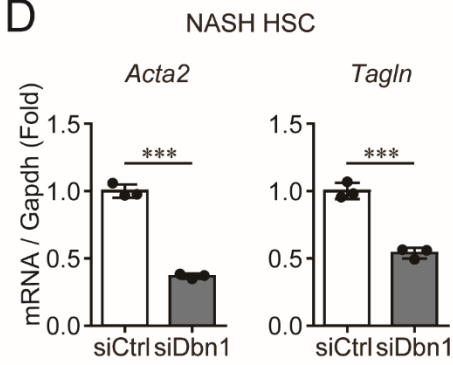
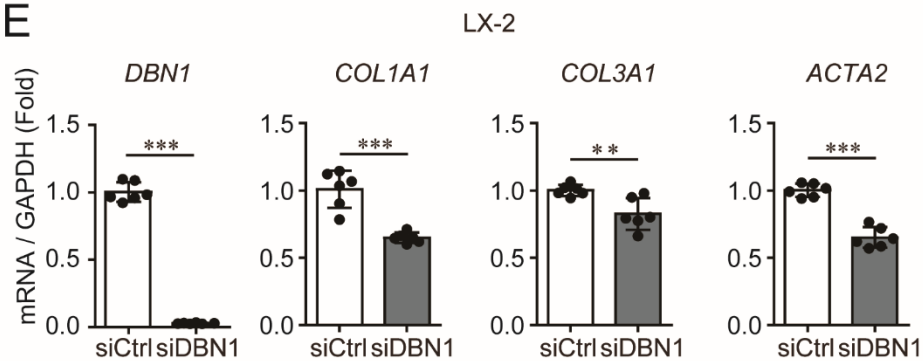
A**B****C****D****E**

Figure 12. Drebrin promotes the production of fibrosis-related genes via actin cytoskeleton formation in activated HSCs.

(A) *Dbn1*, *Coll1a1*, *Col3a1*, *Coll4a1* and *Lox* in activated HSCs isolated from CCl₄-treated livers after treatment with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the activated HSCs isolated from CCl₄-induced hepatic fibrosis model mice were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01; n = 5.

(B) *Dbn1*, *Coll1a1*, *Col3a1*, *Coll4a1* and *Lox* in activated HSCs isolated from CDAHFD-fed livers after treatment with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the activated HSCs isolated from a CDAHFD-induced NASH model mice were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05; n = 3.

(C) *Acta2*, *Tagln* mRNA expression levels in activated HSCs isolated from CCl₄-treated livers after treatment with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the activated HSCs isolated from CCl₄-induced hepatic fibrosis model mice were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 5.

(D) *Acta2*, *Tagln* mRNA expression levels in activated HSCs isolated from CDAHFD-fed livers after treatment with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the activated HSCs isolated from a CDAHFD-induced NASH model mice were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 3.

(E) *DBN1*, *COL1A1*, *COL3A1* and *ACTA2* in LX-2 cells treated with siCtrl or siDBN1. At 72 hr after siRNA transfection, LX-2 cells were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01; n = 6.

Cthrc1 の発現は肝臓の筋線維芽細胞(活性化肝星細胞)においても、**drebrin-MRTF-SRF** 経路により誘導される

最後に、私は活性化肝星細胞においても **drebrin** が **Cthrc1** の発現量を促進するかの検討を行った。**Cthrc1** が CCl_4 あるいはチオアセタミド投与による肝臓線維化時に発現増加し、自己分泌した **Cthrc1** が肝星細胞を活性化し、線維化を促進することが報告されている(30)。実際に、 CCl_4 の投与による肝臓の線維化時に、**Cthrc1** の発現量が増加していることを確認した(Fig. 13A)。さらに、**drebrin** (*Dbn1*) の発現量と同様に、**Cthrc1** の発現量も CDAHFD 投与による肝臓の線維化に伴って増加することを明らかにした(Fig. 13B)。これらの結果に一致して、**CTHRC1** の発現量は、ヒト NASH 患者においても線維化に伴って増加した(Fig. 13C)。

次に、CDAHFD 給餌により線維化した肝臓から単離した活性化肝星細胞において、**Cthrc1** のノックダウンを行った。その結果、線維化関連因子の発現量が抑制されており(Fig. 13D)、**Cthrc1** が NASH 時の肝星細胞においても、線維化を促進している可能性が示唆された。

さらに、**Cthrc1** の発現量が活性化肝星細胞においても、**drebrin** により制御されるかについて検討を行った。*Dbn1* 陽性、*Dbn1* 陰性の肝星細胞(Fig. 11E)を再解析し、**Cthrc1** の発現量を比較したところ、**Cthrc1** は *Dbn1* 陽性の細胞に多く発現していた(Fig. 13E)。実際に、心臓や肺の筋線維芽細胞を用いた実験と同様に、

NASH 肝臓から単離した活性化肝星細胞においても、Dbn1 ノックダウンにより *Cthrc1* の発現量が抑制された(Fig. 13F)。最後に、活性化肝星細胞においても、*Cthrc1* の発現量は MRTF-SRF シグナルに誘導されるかを検討した。そこで NASH 肝臓から単離した活性化肝星細胞に CCG-1423 を処置したところ、*Cthrc1* の発現量が抑制されていることを明らかにした(Fig. 13G)。

以上の結果から、肝臓の活性化肝星細胞においても、*Cthrc1* の発現量は drebrin による MRTF-SRF シグナルにより誘導されることを明らかにした。

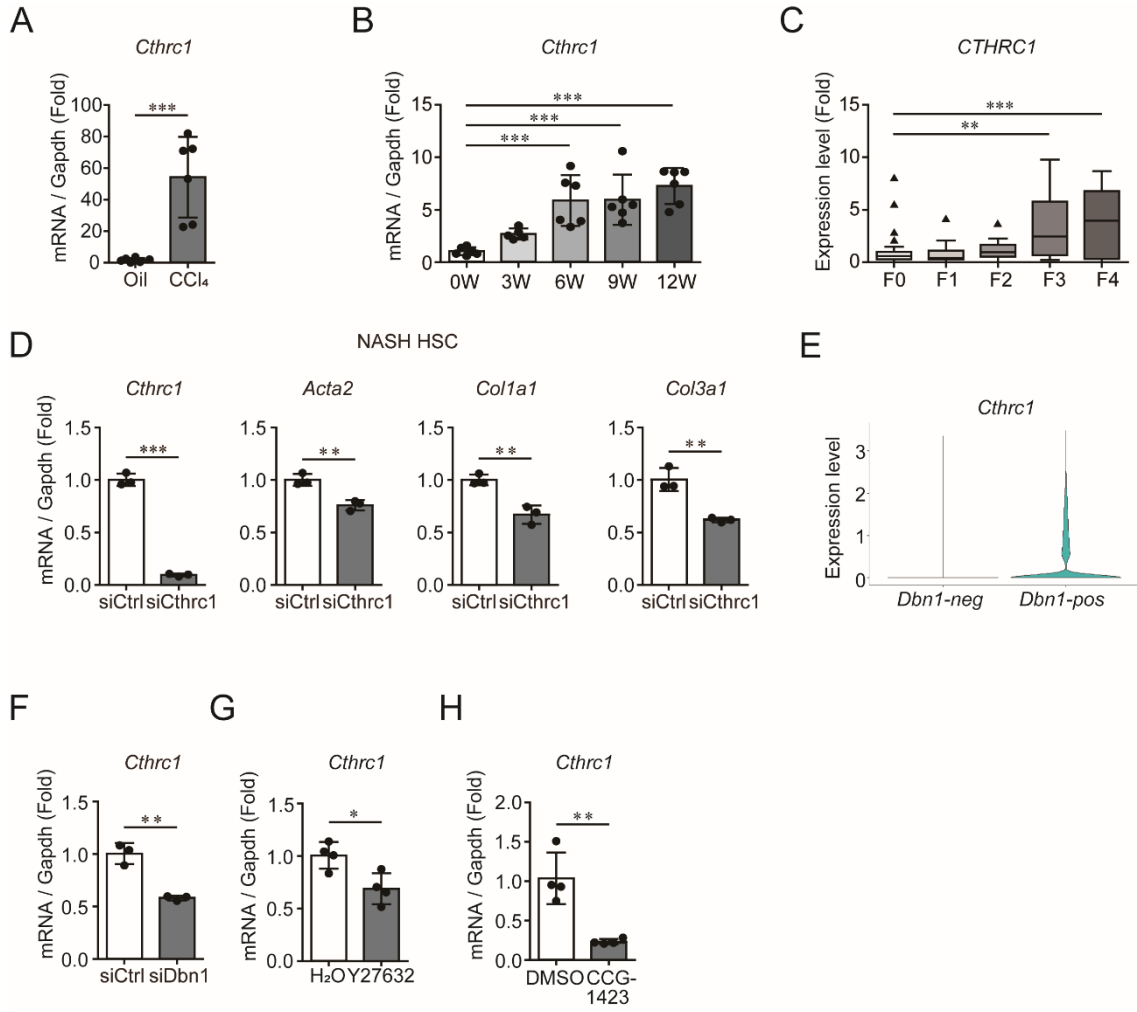


Figure 13. Regulation of *Cthrc1* expression levels via the drebrin-MRTF-SRF axis is also observed in activated HSCs.

(A) *Cthrc1* mRNA expression levels in the livers of mice injected with CCl₄ for 4 weeks. Total RNA extracted from the mouse livers was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; n = 6.

(B) *Cthrc1* mRNA expression levels in the livers of mice fed a CDAHFD for 0, 3, 6, 9, or 12 weeks. Total RNA extracted from the mouse livers was subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001; 0, 6, 9, and 12 weeks: n = 6; 3 weeks: n = 5.

(C) *CTHRC1* mRNA expression levels of patients with various stages (F0–F4) of hepatic fibrosis. The publicly available data (GSE162694) were reanalyzed. Data are presented as the box and whisker plot (tukey style, outliers in black triangles). ***P < 0.001, **P < 0.01; F0: n = 35; F1: n = 30; F2: n = 27; F3: n = 8; F4: n = 12.

(D) The mRNA expression levels of fibrosis-related genes in activated HSCs treated with siCtrl or siCthrc1. At 72 hr after siRNA transfection, the activated HSCs isolated from a CDAHFD-induced NASH model mice were lysed and subjected to qRT-PCR. ***P < 0.001, **P < 0.01; n = 3.

(E) *Cthrc1* mRNA expression levels of *Dbn1*-positive (*Dbn1*-pos) and *Dbn1*-negative (*Dbn1*-neg) HSCs. The violin plots between *Dbn1*-pos and *Dbn1*-neg HSCs were drawn using the data reanalyzed in Fig. 11E.

(F) *Cthrc1* mRNA expression levels in activated HSCs isolated from a CDAHFD-fed livers after treatment with siCtrl or siDbn1. At 72 hr after siRNA transfection, the activated HSCs isolated from a CDAHFD-induced NASH model mice were lysed and subjected to qRT-PCR. **P < 0.01; n = 3.

(G) *Cthrc1* mRNA expression levels in activated HSCs isolated from CCl₄-treated livers after treatment with H₂O or Y27632. Activated HSCs isolated from CCl₄-induced hepatic fibrosis model mice were treated with Y27632 (30 μM) for 24 hr, lysed, and subjected to qRT-PCR. *P < 0.05; n = 4.

(H) *Cthrc1* mRNA expression levels in activated HSCs treated with DMSO or CCG-1423. Activated HSCs isolated from a CDAHFD-induced NASH model mice were starved for 24 hr, treated with CCG-1423 (10 μM) for 24 hr, lysed, and subjected to qRT-PCR. **P < 0.01; n = 4.

考察

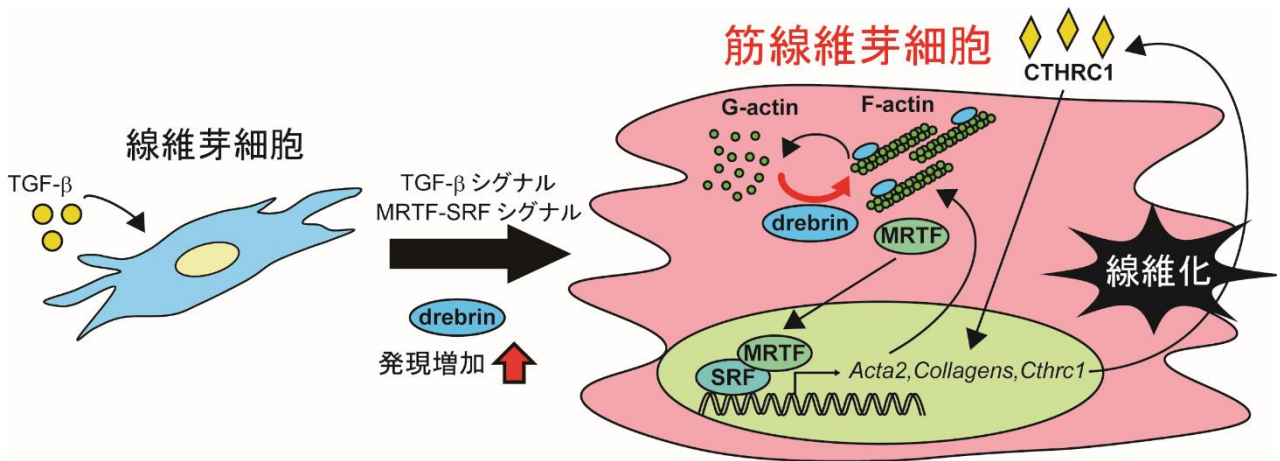


Figure 14. 本研究の概要図

本研究により、私は drebrin が筋線維芽細胞において、F-アクチンの安定化を促進し、さらには線維化促進因子 Cthrc1 の発現を増加させることで、コラーゲン等の線維化関連因子の産生を促進することを見出した(Figure 14)。これまで drebrin は神経の樹状突起スパイン形成やシナプス形成に重要な役割を果たすこと、癒傷形成時のアストロサイトの反応性を制御することなど脳における役割が活発に研究されていった(20, 25, 46)。その一方で、脳以外での drebrin の役割はほとんど解析されていなかった。今回、私は脳以外における drebrin の機能と

して、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化、さらにはコラーゲンの産生を促進するという極めて重要な役割を明らかにした。

発達したアクチン骨格は筋線維芽細胞の特徴の1つであり、筋線維芽細胞の分化能やそのECM産生能に重要な役割を果たす(15, 18)。ECMによるインテグリン刺激、液性因子あるいは機械的刺激によるGタンパク質共役受容体(GPCR: G protein-coupled receptor)の活性化は、Rho-ROCKシグナルを活性化し、F-アクチンを安定化させる(16, 17)。F-アクチンは安定化されると、MRTF-SRFシグナルが亢進し、*Acta2*などのアクチン骨格形成に重要な因子やECMの転写が促進する。このように筋線維芽細胞のアクチン骨格形成とECM産生には、ポジティブフィードバックが存在する。実際にこのフィードバックに重要な因子であるMRTF-AやSRFを欠損したマウスは、野生型マウスに比較して、MI後の心臓線維化が抑制されていることが報告されている(47, 48)。しかしながら、これまで筋線維芽細胞において、直接F-アクチンに結合、安定化させることで、アクチン骨格形成を担う分子は報告されていなかった。今回、私ははじめてdrebrinが筋線維芽細胞のF-アクチンの安定化に強く貢献することを見出した(Figure 14)。

また、drebrinはTGF- β /MRTF-SRFシグナルにより、炎症初期に急速に誘導されることが明らかになった。その後、誘導されたdrebrinはF-アクチンの安定化を介して、MRTF-SRFシグナルを促進する。したがって、炎症初期の線維芽細胞

における MRTF-SRF シグナルよりも、drebrin 発現後の MRTF-SRF シグナルの方がより強く活性化されていると考えられ、この強い MRTF-SRF シグナルの活性化が筋線維芽細胞による豊富な線維化関連因子の産生に大きく寄与していると考えられる。

drebrin は postsynaptic density protein 95 (PSD-95)などのシナプス後タンパク質の集積を引き起こすことで、樹状突起スパイン形成に重要な役割を果たすことが知られている(49)。この drebrin による PSD95 の集積は、シナプス前終末からの神経伝達物質の効率的な受容に寄与する可能性が考えられる。これまで筋線維芽細胞におけるシナプス様構造は報告されていない。しかしながら、筋線維芽細胞は cadherin-11 のホモトロピックな結合を介してマクロファージと物理的に結合していることが報告されている(50)。それゆえ、drebrin は足場となるアクチン骨格を形成することで、その結合に寄与しているのかもしれない。このことから、マクロファージと筋線維芽細胞との物理的な結合部位において、drebrin が多く局在するかを観察することは興味深いと考えられる。

私は筋線維芽細胞において drebrin が転写因子 SRF を介して、Cthrc1 の発現を制御することを明らかにした(Figure 14)。近年の Chip-Seq 解析により、転写因子 SRY-Box Transcription Factor 9 (Sox 9)が Cthrc1 の発現を制御していることが明らかになっている(28)。SOX9 は様々な臓器において、線維化時に筋線維芽細胞で

発現増加し、コラーゲンの産生を促進することが報告されている(51–53)。drebrin は最近、脳の癒痕内のアストロサイトにおいて、SOX9 の核局在を促進することが明らかになった(25)。これらのことを踏まえると、drebrin は MRTF-SRF シグナルの促進に加えて、SOX9 の核内移行の促進によっても、Cthrc1 の発現制御に寄与している可能性が考えられる。

本研究において、私は線維化促進分泌タンパク質である Cthrc1 が心臓、肺、肝臓の筋線維芽細胞において線維化関連因子の産生に寄与することを確認した。その一方で、Cthrc1 による線維化関連因子の産生にどのようなシグナルが介しているかに関しては、検討していない。肝臓の筋線維芽細胞(活性化肝星細胞)においては、オートクライン的に Cthrc1 が TGF- β 受容体を介した TGF- β シグナルを増強することが報告されているため(30)、本研究においても、線維化関連因子の産生には、TGF- β シグナルの促進を介している可能性が高いと考えている。

drebrin は脳以外の通常の組織にはほとんど発現せず、線維化した臓器の筋線維芽細胞に主に発現する。それに加えて、drebrin の発現はヒト患者の心臓、肺、肝臓においても線維化に伴い、発現増加する。それゆえ、drebrin は組織線維化に対する有効な治療薬開発のための魅力的な分子標的になるかもしれない。

参考文献

1. Henderson, N. C., Rieder, F., and Wynn, T. A. (2020) Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature*. **587**, 555–566
2. Jun, J.-I., and Lau, L. F. (2018) Resolution of organ fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 97–107
3. Pakshir, P., and Hinz, B. (2018) The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* **68–69**, 81–93
4. Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E., and Blaxall, B. C. (2016) Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ. Res.* **118**, 1021–1040
5. Talman, V., and Ruskoaho, H. (2016) Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **365**, 563–581
6. Richeldi, L., Collard, H. R., and Jones, M. G. (2017) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet (London, England)*. **389**, 1941–1952
7. Sheka, A. C., Adeyi, O., Thompson, J., Hameed, B., Crawford, P. A., and Ikramuddin, S. (2020) Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. **323**, 1175–1183
8. Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O., and Heikenwalder, M. (2019) From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 411–428
9. Wynn, T. A. (2004) Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 583–594
10. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P., and Fallowfield, J. A. (2014) Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 181–194
11. Xing, L., Chang, X., Shen, L., Zhang, C., Fan, Y., Cho, C., Zhang, Z., and Jiang, H. (2021) Progress in drug delivery system for fibrosis therapy. *Asian J. Pharm. Sci.* **16**, 47–61
12. Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., and Gabbiani, G. (2007) The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* **170**, 1807–1816
13. Gibb, A. A., Lazaropoulos, M. P., and Elrod, J. W. (2020) Myofibroblasts and Fibrosis: Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation. *Circ. Res.* **127**, 427–447
14. Carthy, J. M. (2018) TGF β signaling and the control of myofibroblast

- differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders. *J. Cell. Physiol.* **233**, 98–106
15. Sandbo, N., and Dulin, N. (2011) Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function. *Transl. Res.* **158**, 181–196
 16. Olson, E. N., and Nordheim, A. (2010) Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 353–365
 17. Riches, D. W. H., Backos, D. S., and Redente, E. F. (2015) ROCK and Rho: Promising therapeutic targets to ameliorate pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **185**, 909–912
 18. Tschumperlin, D. J., Ligresti, G., Hilscher, M. B., and Shah, V. H. (2018) Mechanosensing and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 74–84
 19. Shirao, T., and Obata, K. (1985) Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo. *J. Neurochem.* **44**, 1210–1216
 20. Shirao, T., Hanamura, K., Koganezawa, N., Ishizuka, Y., Yamazaki, H., and Sekino, Y. (2017) The role of drebrin in neurons. *J. Neurochem.* **141**, 819–834
 21. Worth, D. C., Daly, C. N., Geraldo, S., Oozeer, F., and Gordon-Weeks, P. R. (2013) Drebrin contains a cryptic F-actin-bundling activity regulated by Cdk5 phosphorylation. *J. Cell Biol.* **202**, 793–806
 22. Hayashi, K., Ishikawa, R., Kawai-Hirai, R., Takagi, T., Taketomi, A., and Shirao, T. (1999) Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin. *Exp. Cell Res.* **253**, 673–680
 23. Mikati, M. A., Grintsevich, E. E., and Reisler, E. (2013) Drebrin-induced stabilization of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **288**, 19926–19938
 24. Shan, Y., Farmer, S. M., and Wray, S. (2021) Drebrin regulates cytoskeleton dynamics in migrating neurons through interaction with CXCR4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073/pnas.2009493118
 25. Schiweck, J., Murk, K., Ledderose, J., Münster-Wandowski, A., Ornaghi, M., Vida, I., and Eickholt, B. J. (2021) Drebrin controls scar formation and astrocyte reactivity upon traumatic brain injury by regulating membrane trafficking. *Nat. Commun.* **12**, 1490
 26. Pyagay, P., Heroult, M., Wang, Q., Lehnert, W., Belden, J., Liaw, L., Friesel, R. E., and Lindner, V. (2005) Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ. Res.* **96**, 261–268

27. Ke, Z., He, W., Lai, Y., Guo, X., Chen, S., Li, S., Wang, Y., and Wang, L. (2014) Overexpression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. **5**, 9410–9424
28. Ruiz-Villalba, A., Romero, J. P., Hernández, S. C., Vilas-Zornoza, A., Fortelny, N., Castro-Labrador, L., San Martin-Uriz, P., Lorenzo-Vivas, E., García-Olloqui, P., Palacio, M., Gavira, J. J., Bastarrika, G., Janssens, S., Wu, M., Iglesias, E., Abizanda, G., de Morentin, X. M., Lasaga, M., Planell, N., Bock, C., Alignani, D., Medal, G., Prudovsky, I., Jin, Y.-R., Ryzhov, S., Yin, H., Pelacho, B., Gomez-Cabrero, D., Lindner, V., Lara-Astiaso, D., and Prósper, F. (2020) Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals a Crucial Role for CTHRC1 (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) Cardiac Fibroblasts After Myocardial Infarction. *Circulation*. **142**, 1831–1847
29. Tsukui, T., Sun, K.-H., Wetter, J. B., Wilson-Kanamori, J. R., Hazelwood, L. A., Henderson, N. C., Adams, T. S., Schupp, J. C., Poli, S. D., Rosas, I. O., Kaminski, N., Matthay, M. A., Wolters, P. J., and Sheppard, D. (2020) Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat. Commun.* **11**, 1920
30. Li, J., Wang, Y., Ma, M., Jiang, S., Zhang, X., Zhang, Y., Yang, X., Xu, C., Tian, G., Li, Q., Wang, Y., Zhu, L., Nie, H., Feng, M., Xia, Q., Gu, J., Xu, Q., and Zhang, Z. (2019) Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF- β signaling. *EBioMedicine*. **40**, 43–55
31. Sweet, M. E., Cocciolo, A., Slavov, D., Jones, K. L., Sweet, J. R., Graw, S. L., Reece, T. B., Ambardekar, A. V., Bristow, M. R., Mestroni, L., and Taylor, M. R. G. (2018) Transcriptome analysis of human heart failure reveals dysregulated cell adhesion in dilated cardiomyopathy and activated immune pathways in ischemic heart failure. *BMC Genomics*. **19**, 812
32. Farbehi, N., Patrick, R., Dorison, A., Xaymardan, M., Janbandhu, V., Wystub-Lis, K., Ho, J. W., Nordon, R. E., and Harvey, R. P. (2019) Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *Elife*. 10.7554/eLife.43882
33. Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D. J., and Lan, H. Y. (2016) TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 325–338
34. Crider, B. J., Risinger, G. M. J., Haaksma, C. J., Howard, E. W., and Tomasek, J. J. (2011) Myocardin-related transcription factors A and B are key regulators of TGF- β 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation. *J. Invest. Dermatol.*

- 131**, 2378–2385
35. Abdalla, M., Goc, A., Segar, L., and Somanath, P. R. (2013) Akt1 mediates α -smooth muscle actin expression and myofibroblast differentiation via myocardin and serum response factor. *J. Biol. Chem.* **288**, 33483–33493
 36. Kanisicak, O., Khalil, H., Ivey, M. J., Karch, J., Maliken, B. D., Correll, R. N., Brody, M. J., J Lin, S.-C., Aronow, B. J., Tallquist, M. D., and Molkenin, J. D. (2016) Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat. Commun.* **7**, 12260
 37. Li, X., and Wang, J. (2020) Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis. *Int. J. Biol. Sci.* **16**, 2014–2028
 38. Ley, B., Collard, H. R., and King, T. E. J. (2011) Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 431–440
 39. Della Latta, V., Cecchetti, A., Del Ry, S., and Morales, M. A. (2015) Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol. Res.* **97**, 122–130
 40. Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D. L., Brooks, R. W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y. S., Tchkonja, T., Robbins, P. D., Aubry, M. C., Passos, J. F., Kirkland, J. L., Tschumperlin, D. J., Kita, H., and LeBrasseur, N. K. (2017) Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* **8**, 14532
 41. Zhang, G., Wang, X., Chung, T.-Y., Ye, W., Hodge, L., Zhang, L., Chng, K., Xiao, Y.-F., and Wang, Y. J. (2020) Carbon tetrachloride (CCl₄) accelerated development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/steatohepatitis (NASH) in MS-NASH mice fed western diet supplemented with fructose (WDF). *BMC Gastroenterol.* **20**, 339
 42. Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., Ito, T., Katsume, A., and Sudoh, M. (2013) An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int. J. Exp. Pathol.* **94**, 93–103
 43. Pappachan, J. M., Babu, S., Krishnan, B., and Ravindran, N. C. (2017) Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **5**, 384–393
 44. Pantano, L., Agyapong, G., Shen, Y., Zhuo, Z., Fernandez-Albert, F., Rust, W., Knebel, D., Hill, J., Boustany-Kari, C. M., Doerner, J. F., Rippmann, J. F.,

- Chung, R. T., Ho Sui, S. J., Simon, E., and Corey, K. E. (2021) Molecular characterization and cell type composition deconvolution of fibrosis in NAFLD. *Sci. Rep.* **11**, 18045
45. Yang, W., He, H., Wang, T., Su, N., Zhang, F., Jiang, K., Zhu, J., Zhang, C., Niu, K., Wang, L., Yuan, X., Liu, N., Li, L., Wei, W., and Hu, J. (2021) Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals a Hepatic Stellate Cell-Activation Roadmap and Myofibroblast Origin During Liver Fibrosis in Mice. *Hepatology.* **74**, 2774–2790
46. Koganezawa, N., Hanamura, K., Sekino, Y., and Shirao, T. (2017) The role of drebrin in dendritic spines. *Mol. Cell. Neurosci.* **84**, 85–92
47. Small, E. M., Thatcher, J. E., Sutherland, L. B., Kinoshita, H., Gerard, R. D., Richardson, J. A., Dimaio, J. M., Sadek, H., Kuwahara, K., and Olson, E. N. (2010) Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction. *Circ. Res.* **107**, 294–304
48. Davis, J., Salomonis, N., Ghearing, N., Lin, S.-C. J., Kwong, J. Q., Mohan, A., Swanson, M. S., and Molkentin, J. D. (2015) MBNL1-mediated regulation of differentiation RNAs promotes myofibroblast transformation and the fibrotic response. *Nat. Commun.* **6**, 10084
49. Takahashi, H., Sekino, Y., Tanaka, S., Mizui, T., Kishi, S., and Shirao, T. (2003) Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 6586–6595
50. Lodyga, M., Cambridge, E., Karvonen, H. M., Pakshir, P., Wu, B., Boo, S., Kiebalo, M., Kaarteenaho, R., Glogauer, M., Kapoor, M., Ask, K., and Hinz, B. (2019) Cadherin-11-mediated adhesion of macrophages to myofibroblasts establishes a profibrotic niche of active TGF- β . *Sci. Signal.* 10.1126/scisignal.aao3469
51. Scharf, G. M., Kilian, K., Cordero, J., Wang, Y., Grund, A., Hofmann, M., Froese, N., Wang, X., Kispert, A., Kist, R., Conway, S. J., Geffers, R., Wollert, K. C., Dobрева, G., Bauersachs, J., and Heineke, J. (2019) Inactivation of Sox9 in fibroblasts reduces cardiac fibrosis and inflammation. *JCI insight.* 10.1172/jci.insight.126721
52. Gajjala, P. R., Kasam, R. K., Soundararajan, D., Sinner, D., Huang, S. K., Jegga, A. G., and Madala, S. K. (2021) Dysregulated overexpression of Sox9 induces fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *JCI insight.* 10.1172/jci.insight.152503

53. Athwal, V. S., Pritchett, J., Martin, K., Llewellyn, J., Scott, J., Harvey, E., Zaitoun, A. M., Mullan, A. F., Zeef, L. A. H., Friedman, S. L., Irving, W. L., Hanley, N. A., Guha, I. N., and Piper Hanley, K. (2018) SOX9 regulated matrix proteins are increased in patients serum and correlate with severity of liver fibrosis. *Sci. Rep.* **8**, 17905

謝辞

本研究の遂行および論文作製にあたり、終始丁寧なご指導、ご配慮を賜りました九州大学大学院薬学研究院疾患制御学分野 仲矢道雄准教授 に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なご協力を賜りました九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野 黒瀬等教授、長坂明臣助教 に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なご協力を賜りました九州大学大学院薬学府薬効安全性学分野 上野智之氏、間恵恭輔氏、盛永拓実氏、豊田史氏、疾患制御学分野堀井雄真氏、瀧澤宣郎氏、山内佑斗氏に深く感謝いたします。

ともに研究生活を送り、多くのご協力とご支援を賜りました九州大学大学院薬学府疾患制御学分野、薬効安全性学分野の皆様から心から感謝いたします。

本研究のために犠牲となった数多くの尊い命に感謝し、ご冥福をお祈りいたします。

最後に、長きにわたる学生生活において終始激励し、惜しみないご支援とご協力をいただきました家族、親友に心から感謝いたします。

本研究成果の一部は、原著論文として以下の雑誌に掲載された。

“Drebrin is induced during myofibroblast differentiation and enhances the production of fibrosis-related genes”

Biochem Biophys Res Commun. 2020 Aug 20;529(2):224-230.

“The well-developed actin cytoskeleton and Cthrc1 expression by actin-binding protein drebrin in myofibroblasts promote cardiac and hepatic fibrosis”

J Biol Chem. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102934>. In press.

受賞歴

・第 19 回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム 2020

(オンライン開催・2020 年 8 月) 優秀発表賞

・第 54 回日本結合組織学会

(大阪・2022 年 6 月) Young Investigator Award