

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 :

【序論】

線維化とは、炎症などを起点として、組織にコラーゲン等の過剰な細胞外マトリックスタンパク質が蓄積した状態である。線維化した組織は、可塑性を失うことで、最終的には機能不全に陥る。例えば、心筋梗塞 (Myocardial Infarction: MI) により線維化した心臓は心不全へと、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) により線維化した肺は重篤な呼吸器障害へと、非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) により線維化した肝臓は、肝硬変や肝がんへと繋がる。これらのように、線維化は様々な慢性疾患に密接に関与しているため、線維化に対する有効な治療薬の開発が早期に望まれている。

線維化を実行する細胞は、通常の組織に存在せず、線維化した組織にのみ出現し、過剰な細胞外マトリックスタンパク質を産生する筋線維芽細胞という細胞群である。筋線維芽細胞は線維芽細胞をはじめとする様々な細胞が炎症時に血球系細胞により分泌される TGF- β を代表するサイトカイン刺激を受けて、分化することで生じる。この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。しかしながら、その発達したアクチン骨格の形成メカニズムおよびその機能は未だ不明な点が多い。

今回、私は正常時の心臓にはほとんど発現せず、線維化した心臓において発現が大きく増加するアクチン結合タンパク質として、drebrin (遺伝子名 *Dbn1*) を同定した。そこで、本研究では、drebrin の線維化における影響を解明することを目的に研究を行った。

【方法】

心筋梗塞 (Myocardial Infarction: MI) モデルマウスの作製

8-10 週齢の雄性マウスを気道確保を行った上で開胸し、心臓の左冠動脈前下行枝を縫合糸により結紮し、心臓の線維化を誘導した。

ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスの作製

6-8 週齢の雌性マウスの気管支からカニューレを用いて、ブレオマイシンを単回投与することで肺の線維化を誘導した。

非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) モデルマウスの作製

6-8 週齢の雄性マウスにコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) を長期間給餌することにより肝臓の線維化を誘導した。

筋線維芽細胞の分取

筋線維芽細胞は、線維化を誘導した組織をコラゲナーゼで処置し、筋線維芽細胞を含む細胞を単離し、赤血球を除いた後、プラスチックプレートで 1 日間培養した。その後、接着している細胞を Accutase を用いて剥がし、抗 CD45 Microbeads を 20 分間反応させた後、MS カラムを用いた磁気細胞分離を行った。CD45 陽性の血球系細胞を取り除き、CD45 陰性の細胞群を筋線維芽細胞として実験に使用した。

【結果】

1. drebrin は線維化した心臓の筋線維芽細胞に発現する

まず、drebrin の発現細胞を同定するために、偽処置あるいは心筋梗塞処置後の心臓の間質細胞の scRNA-Seq データ (E-MTAB-7376) を用いた解析を行った。その結果、drebrin は筋線維芽細胞を含む線維芽細胞に特異的に発現することを見出した (図 1A)。また、心臓の間質細胞以外の実質細胞である心筋細胞に drebrin が発現するかを、高感度 *In situ* hybridization により検討したところ、drebrin は心筋細胞には発現していなかった (図 1B)。

そこでさらに、線維化したマウス心臓において、drebrin 抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、drebrin は筋線維芽細胞のマーカー蛋白質である α -SMA 陽性の細胞に発現していた (図 1C)。

以上の結果から、drebrin は線維化マウス心臓の筋線維芽細胞に特異性高く発現することを見出した。

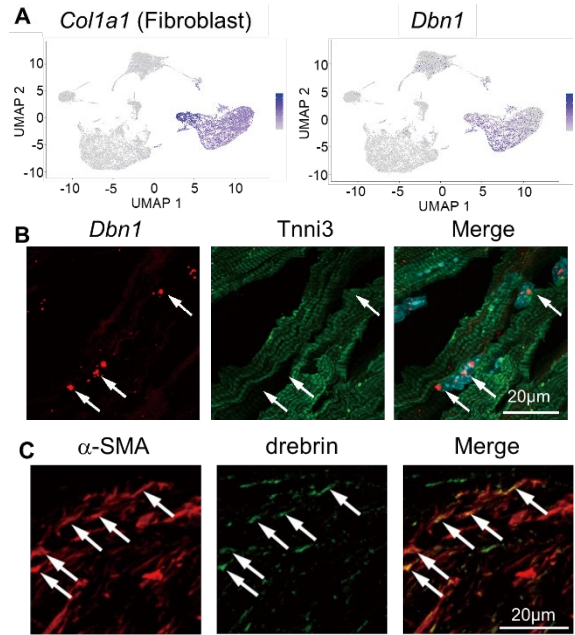


図 1. drebrin は筋線維芽細胞に発現する

2. drebrin は筋線維芽細胞において、コラーゲン等の線維化関連因子の産生を促進する

次に、drebrin の筋線維芽細胞によるコラーゲン産生に与える影響について解析した。線維化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結果、コラーゲンなどの線維化関連因子の産生が抑制された。

以上の結果から、drebrin は心臓の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ことが明らかとなった。

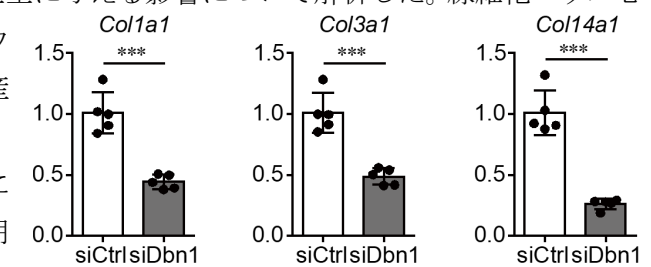


図 2. drebrin は線維化関連因子の発現を促進する

3. drebrin は筋線維芽細胞のアクチン骨格形成を促進する

drebrin の線維化促進メカニズムを解析するため、偽処置あるいは心筋梗塞処置後の心臓から単離した間質細胞の scRNA-Seq データ (E-MTAB-7376) を用いた解析を行った。線維芽細胞を drebrin 陰性 (*Dbn1_neg*)、陽性 (*Dbn1_pos*) に分け (図 3A)、drebrin 陽性群に多い分子を解析したところ、*Acta2*、*Tagln* など、アクチン骨格形成分子が多く認められた (図 3B)。

実際に、心臓の筋線維芽細胞において、drebrin をノックダウンしたところ、*Acta2*、*Tagln* の mRNA 量 (図 3C) およびタンパク質量 (図 3D) が抑制されていた。

以上の結果から、drebrin は筋線維芽細胞のアクチン骨格形成を促進することが明らかになった。

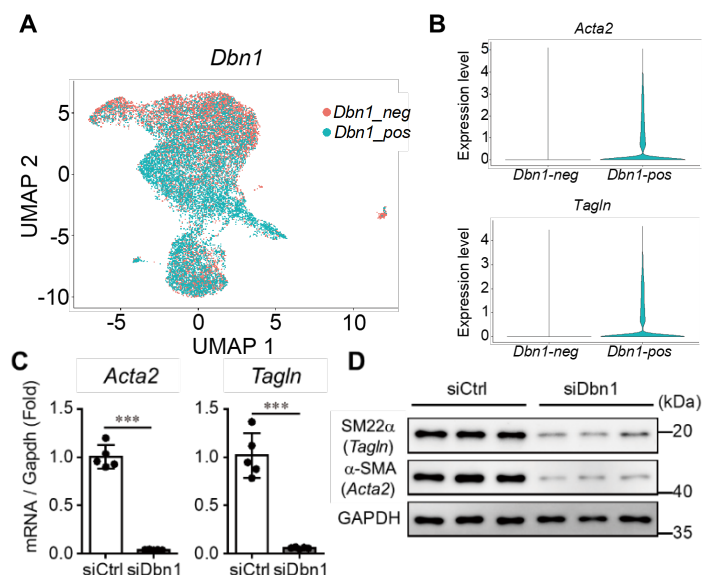


図 3. drebrin は筋線維芽細胞のアクチン骨格形成に寄与する

4. drebrin は MRTF の核内移行を制御し、MRTF-SRF シグナルを促進する

次に私はアクチン骨格形成に関与する主要なシグナルである MRTF-SRF シグナルに着目した。転写共役因子である 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、様々な刺激により 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、核移行する。

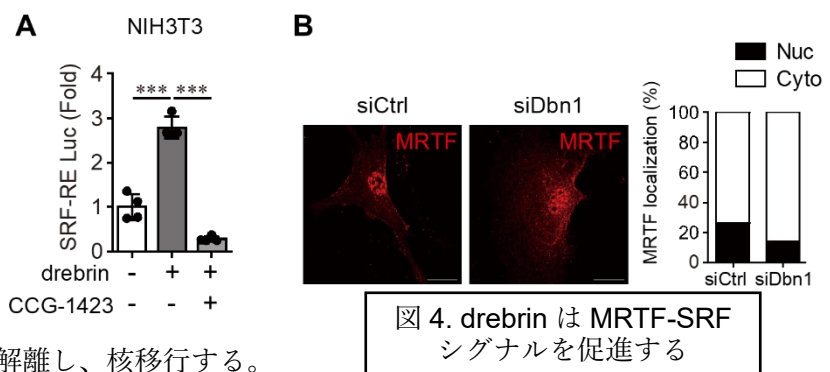


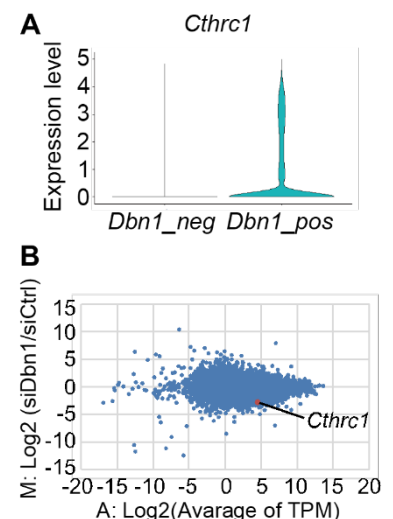
図 4. drebrin は MRTF-SRF シグナルを促進する

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タンパク質の産生を促進することで線維化を悪化させる。そこで、私は drebrin が MRTF-SRF シグナルに及ぼす影響について解析した。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 レポーター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、その促進効果は MRTF の阻害剤である CCG-1423 処置により抑制されることが明らかになった(図 4A)。さらに、この結果に一致して、筋線維芽細胞において drebrin をノックダウンし、MRTF 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、MRTF の核移行が抑制されていた(図 4B)。

以上の結果から、drebrin は筋線維芽細胞において、MRTF-SRF シグナルを促進することで、アクチン骨格形成や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。

5. drebrin は MRTF-SRF シグナルを介して、線維化促進分泌タンパク質 Cthrc1 の発現を促進する

次に、drebrin によるアクチン骨格形成がどのような分子を介して、線維化を促進するのかについて検討を行った。drebrin 陰性 (*Dbn1_neg*)、陽性 (*Dbn1_pos*) に分けた線維芽細胞のシングルセル解析(図 3A)と drebrin をノックダウンした筋線維芽細胞の RNA-Seq 解析の包括的データセットを用いて、drebrin により強く発現が誘導される線維化促進分子を探索した。その結果、線維化を促進するとの報告がある分泌タンパク質 Cthrc1 が drebrin 陽性細胞に多く発現しており(図 5A)、drebrin ノックダウンにより発現量が大きく減少することを見出した(図 5B)。



drebrin は MRTF-SRF シグナルを強く促進するため、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、MRTF の阻害剤である CCG-1423 あるいは転写因子 SRF をノックダウンしたときの Cthrc1 の発現量を調べた。その結果、いずれにおいても、Cthrc1 の発現量は有意に抑制された(図 5C)。

以上の結果から、drebrin は MRTF-SRF シグナルを介して、Cthrc1 の発現を誘導し、筋線維芽細胞の線維化関連因子の産生を促進することを見出した。

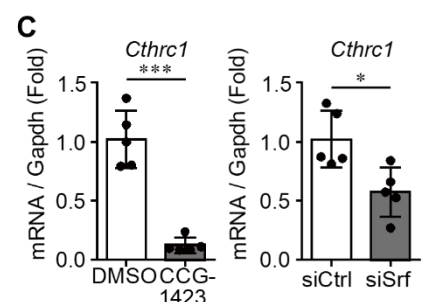


図 5. drebrin は線維化促進分泌タンパク質 Cthrc1 の発現を促進する

6. drebrin は肺においてもアクチン骨格形成と Cthrc1 の発現誘導を介して線維化を促進する

次に、私は drebrin が肺の線維化にも関与するののかについて検討した。ブレオマイシンの投与によりマウスに肺の線維化を誘導したところ、drebrin は肺の線維化時に発現増加し(図 6A)、かつ筋線維芽細胞に特異的に発現することを見出した(図 6B)。

さらに、線維化マウス肺の筋線維芽細胞において、drebrin をノックダウンしたところ、線維化関連因子(図 6C)、アクチン骨格形成因子(図 6D)のいずれ

の発現量も大きく抑制されることが明らかになった。また、線維化促進分子 Cthrc1 の発現量も drebrin ノックダウン(図 6E)、MRTF 阻害剤 CCG-1423 処置(図 6F)の両方で有意に抑制された。

以上の結果から、drebrin は肺においても線維化時に筋線維芽細胞に発現増加し、そのアクチン骨格形成に寄与し、Cthrc1 の発現を介して線維化を促進することを見出した。

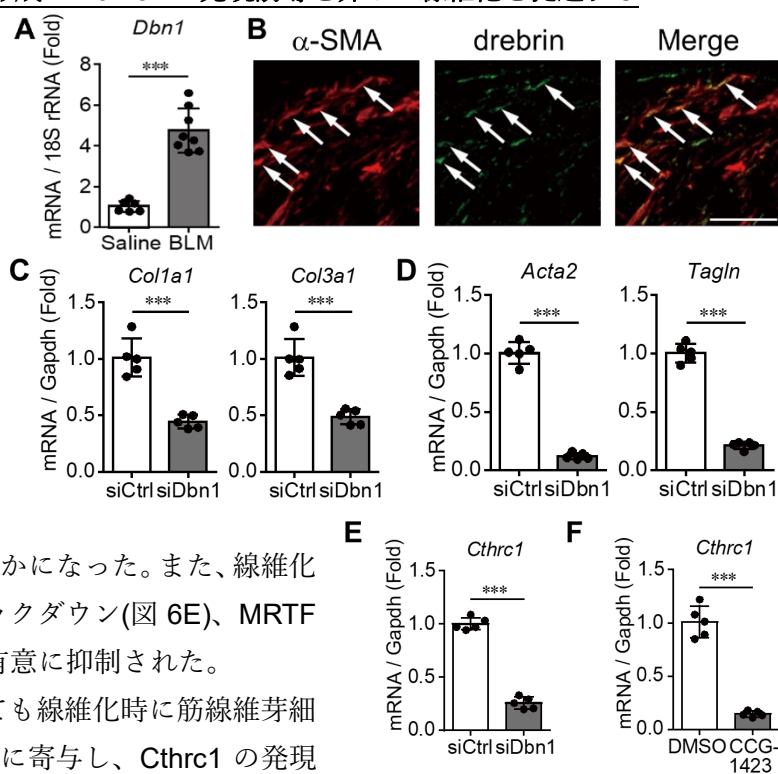


図 6. drebrin は肺においても線維化を促進する

7. drebrin は肝臓においてもアクチン骨格形成と Cthrc1 の発現誘導を介して線維化を促進する

最後に、drebrin が肝臓の線維化にも関与するののかを検討した。まず NASH モデルマウスを用いた実験により、drebrin は肝臓の線維化時にも発現増加し、肝臓における主たるコラーゲン産生細胞である肝星細胞に発現することを見出した。

次に、線維化した肝臓から活性化肝星細胞(筋線維芽細胞)を単離し、drebrin をノックダウンしたところ、心臓、肺の場合と同様に、線維化関連因子とアクチン骨格形成因子の有意な発現抑制が認められた。さらに、Cthrc1 の発現量も drebrin ノックダウンと CCG-1423 処置により有意に抑制された。

以上の結果から、drebrin は肝臓においても線維化時に活性化肝星細胞(筋線維芽細胞)において発現誘導され、そのアクチン骨格形成の促進、Cthrc1 の発現増加を介して線維化を促進することを見出した。

【まとめ】

本研究において、drebrin が筋線維芽細胞に発現増加し、MRTF-SRF シグナルの促進を介して、そのアクチン骨格形成や Cthrc1 などの線維化関連因子の産生を促進することを初めて明らかにした。発達したアクチン骨格は筋線維芽細胞の主たる特徴であり、コラーゲン産生を介したポジティブフィードバックにより、線維化のさらなる悪化に寄与する。本研究成果は、線維化の増悪における筋線維芽細胞のアクチン骨格形成に drebrin が関与していることを示した新しい知見である。

【主な発表論文】

1. Hironaka T, et al., *J. Biol. Chem.* (2023) (In press)
2. Hironaka T, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2020) 529(2):224-230.
3. Takizawa N, Hironaka T, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2021) 561:180-186.