

脳卒中に関与する細胞接着分子である CLDND1 の発現調節法の 開発を目指して

志摩 亜季保、松岡 浩史、道原 明宏

Developing a method for regulating the expression of CLDND1, a cell adhesion molecule involved in stroke

Akiho Shima, Hiroshi Matsuoka, Akihiro Michihara

ABSTRACT

Stroke is a disease that presents with rapid consciousness disorder and neurological symptoms due to obstruction or rupture of cerebrovascular disease. Aftereffects such as hemiplegia, speech disorder, and higher dysfunction are observed depending on the damaged site and severity of cerebrovascular disease. The blood–brain barrier (BBB) controls mass transfer between blood and brain tissue through tight junctions (TJs) and adhesive junctions between vascular endothelial cells. Among them, claudins are the major component with 27 isoforms identified in human TJs. Increased intercellular substance permeability in blood vessels is involved in the development and exacerbation of stroke through the disruption of BBB. In particular, increased cerebrovascular permeability is associated with decreased claudin domain-containing 1 (CLDND1) expression, which belongs to the family of TJs. Decreased CLDND1 results in increased vascular permeability due to hypoplasia of TJs and induces stroke through BBB disruption. However, transcriptional regulation of CLDND1 has not been studied extensively. In this review, we report the results of studies on the regulation mechanism and function of CLDND1 expression in vascular endothelial cells.

はじめに

脳卒中は、脳血管の閉塞または破裂により急激な意識障害や神経症状を呈する疾患であり、脳血管の損傷部位や重症度により片麻痺、言語障害、高次機能障害などの後遺症を発症する。血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) は、血管内皮細胞間の密着結合 (Tight junctions: TJs) や接着結合 (Adherens junctions: AJs) により血液と脳組織間の物質移動を制御しバリア機能を担っている¹⁻⁴⁾。TJs および AJs は、それぞれ接着分子

であるクローディン、オクルディンおよびカドヘリンにより形成されている。血管における細胞間の物質透過性亢進は、BBB の破綻を通じて脳卒中の発症および悪化に関与している²⁾。クローディンは、細胞質側にアミノ末端とカルボキシ末端、細胞外に2つのループを有する4回膜貫通型タンパク質であり、細胞外第1ループにクローディン共通モチーフ(W-GLW-C-C)が保存されている⁵⁻⁷⁾。ヒトにおいてクローディンは27種類同定されており、その種類により組織分布や転写調節機構は異なっている⁸⁾。これまで共同研究者らと共に、コラゲナーゼ誘発性脳出血マウスの出血部位において、クローディンファミリーの1つである Claudin domain containing 1 (CLDND1)タンパク質レベルの低下ならびにヒト血管内皮細胞中の CLDND1 ノックダウンによる物質透過性の亢進を報告してきた⁹⁾。これらのことから、CLDND1 の低下は、TJs 形成不全による血管透過性の亢進を引き起こし、BBB の崩壊を通じて脳卒中を誘発することが考えられる。そこで本総説では、血管内皮細胞における CLDND1 の発現調節機構および機能に関する研究の結果について報告する。

細胞接着分子 CLDND1 の転写調節に関与する転写因子 ROR α の同定¹⁰⁾

核内受容体 Retinoic acid receptor-related orphan receptor α (ROR α) は、核内受容体スーパーファミリーのメンバーであり、ROR 応答エレメント (RORE) にモノマーとして結合し、標的遺伝子の転写を調節している¹¹⁾。ROR α は、肝臓、骨格筋、皮膚、肺、脂肪組織、腎臓、胸腺および脳など多くの組織で発現している。これまでに ROR α の標的遺伝子として、脂質代謝に関与するアポリポタンパク質 (ApoA1、ApoC3 および ApoA5) や血中グルコースの制御に関与する糖新生律速酵素 (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase、Glucose-6-phosphatase) が報告されている¹²⁻¹⁵⁾。ROR α 遺伝子のリガンド結合ドメインを欠失させた変異マウスでは、変異 ROR α の発現を通じて、小脳の異常な発達を引き起こし、血管機能障害、免疫異常、筋肉欠損、骨粗しょう症および食餌誘発性アテローム性動脈硬化症などの表現型を生じる^{16,17)}。また、動脈硬化の進行により、血中において細胞接着分子 CLDND1 に対する抗体は増加することが示されている¹⁸⁾。動脈硬化を含む多種多様な疾患に関わる ROR α は CLDND1 の転写調節においても関与している可能性がある。

CLDND1 の転写調節に対する ROR α の関与を明らかにするために、CLDND1 プロモーター中に存在する RORE の同定を *in silico* 解析により検討した。UCSC Genome Browser に統合された ENCODE データによる DNaseI 感受性試験およびアセチル化ヒストンの ChIP-seq により調査した結果、CLDND1 プロモーター領域 (-297 から -286) に RORE が存在していた。そこで、ラット組織およびヒト細胞株における ROR α および CLDND1 mRNA 量の相関性を qRT-PCR により検討した。すると、CLDND1 と ROR α mRNA 量の間で正の相関性が示された (Figure 1, 2)。

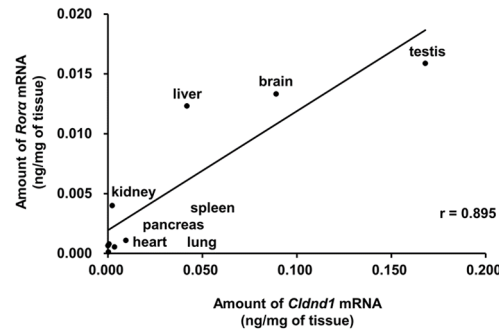


Figure 1. Association between CLDND1 and ROR α expression across various tissues in rat. The mRNA levels of Ror α , Clnd1 and Cldn1 from various rat tissues were determined simultaneously to obtain a regression line. Correlation coefficients were obtained after simple curve-fit analysis of the relative expression of Ror α and Clnd1 genes.

文献 10)より改変引用

ROR α の発現亢進は低酸素条件下で引き起こされることが報告されている^{19,20}。そこで、疑似低酸素(コバルト処理)条件下の血管内皮細胞における ROR α および CLDND1 mRNA レベルを評価した。CLDND1 mRNA レベルは、ROR α 安定発現株(ROR α 過剰発現細胞)および疑似低酸素条件(ROR α 増加)により誘導された ROR α に依存して増加することが示された(データ未掲載)。

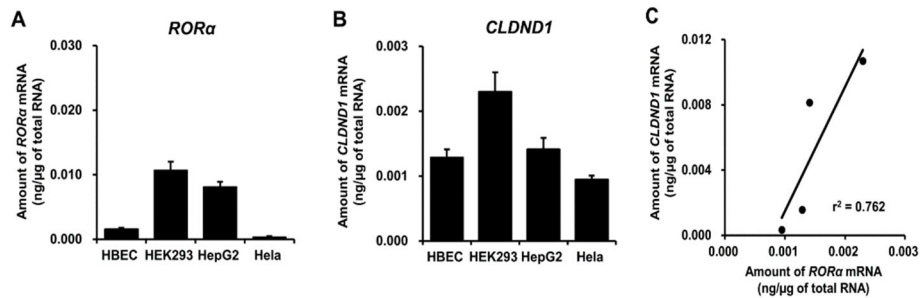


Figure 2. Comparison of endogenously expressed genes in human cells. Relative mRNA levels of ROR α (A), and CLDND1 (B) in 1 μ g of total RNA of HBEC, HEK293, HepG2, Hela cells as quantified by qRT-PCR. All data are the means \pm S.E. of three independent experiments. Relationships between CLDND1 and ROR α expression (C) was determined simultaneously by drawing the regression line.

文献 10)より改変引用

CLDND1 の転写調節に対する ROR α の関与が示唆されたため、CLDND1 推定 RORE に対する ROR α 応答性についてルシフェラーゼレポーター解析により検討した。HEK293 中の変異型 RORE を含むレポーター (pCLDND1-mt) の応答性は、野生型 RORE を含むレポーター (pCLDND1-wt) と比べて、約 50% の有意な低下を示した (Figure 3A)。ROR α 発現ベクター (pROR α) と野生型 RORE の 1 から 3 回繰り返し配列を含むレポーター (pROREx1, x2, または x3-wt) の共発現における応答性は、コントロールベクター (pGVP2) の共発現と比べて、それぞれ 1.6 倍、3.2 倍および 12.2 倍の増加を示した (Figure 3B)。ROR α の CLDND1-RORE に対する応答性が示された。

加えて、CLDND1-RORE に対する ROR α の結合性について EMSA 法により結果より検討した。CLDND1 の野生型 RORE を含む 20 bp のプローブ (CLDND1-ROREwt) を 32P で末端標識し、in vitro 翻訳で得た ROR α と反応させた。既知の RORE を含む I- κ B の非標識プローブ過剰添加により CLDND1-ROREwt に対する ROR α の結合性は阻害された。それに対し、CLDND1 の変異型 RORE を含む非標識プローブ (CLDND1-ROREmt) は、ROR α の結合性に阻害を示さなかった。さらに、抗 ROR α 抗体の添加は、DNA-タンパク質と抗体の複合体形成によりスーパーシフトが示された (データ未掲載)。これらのことから、ROR α が CLDND1-RORE に直接結合することが示された。

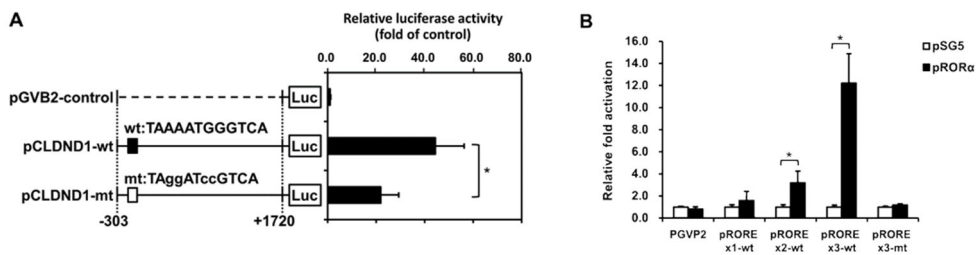


Figure 3. The ROR response element (RORE) of CLDND1 is directly activated by ROR α . (A)

Transactivation of the RORE of the CLDND1 promoter by the ROR α . The reporter plasmids pCLDND1-wt

containing the wild-type RORE (TAAAATGGGTCA) and pCLDND1-mt containing the mutated-type RORE (TAggATccGTCA, mutated region lowercase) were engineered to contain a fragment of the human CLDND1 promoter region from -303 to +1720 bp. HEK293 were transfected with luciferase under the control of the CLDND1 promoter. Data shown represent fold transactivation over basal activity and are reported as the means \pm S.E. (n = 4). *P<0.05. **(B)** HBEC were transfected with the ROR α expression vector (closed bars) or empty vector pSG5 (opened bars) along with luciferase driven by 1 to 3 direct repeats of wild-type (pROREx1, x2 and x3-wt) or mutated (pROREx3-mt) RORE in the CLDND1 promoters. Data are the means \pm S.E. (n = 4). *P<0.05.

文献 10)より改変引用

CLDND1 の転写調節に対する ROR α の関与についてさらに立証するために、内因性 ROR α ノックダウンによる CLDND1 および TJs 関連遺伝子の mRNA レベルを siRNA 導入による qRT-PCR により検討した。ROR α を標的とする siRNA (siROR α) による ROR α および CLDND1 mRNA レベルは、コントロール (siGFP) と比べて、それぞれ 28.3% および 64.5% 抑制された。非標的スクランブル変異型 siRNA (siROR α -mt) は、ROR α および CLDND1 mRNA レベルに影響を示さなかった。TJs 機能に関わる CLDN1、ZO-1、CDH および OCLN mRNA レベルを評価した結果、これらの遺伝子発現に対する ROR α ノックダウンの影響は確認されなかった (Figure 4)。これらの結果から、CLDND1 は ROR α の直接的な標的遺伝子であることが示された。

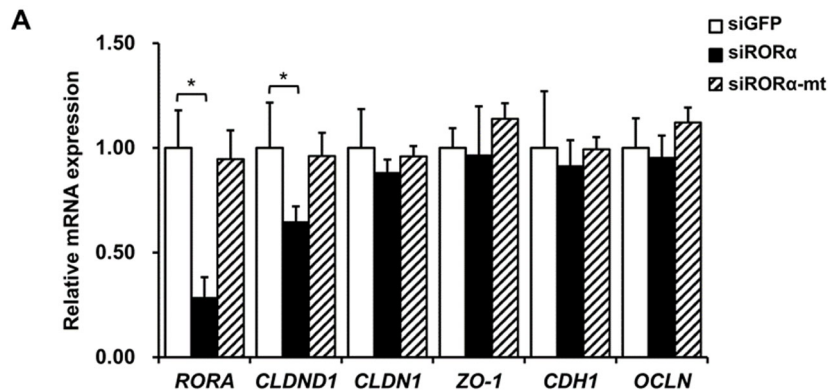


Figure 4. Effect of ROR α deficiency on CLDND1 expression. (A) Suppression of endogenous ROR α by siRNA significantly decreased CLDND1 mRNA in HBEC. HBEC were transfected with 50nM siRNA and analyzed by qRT-PCR to quantify the expression of ROR α , CLDND1, CLDN1, ZO-1, CDH1 and OCLN. Opened bars represent cells treated with siRNA targeting green fluorescent protein (siGFP) as negative control. Closed bars are for cells treated with siRNA targeting a sequence around 1388 bp downstream of the ROR α start codon (siROR α). Hatched bars represent cells treated with non-targeting scramble siRNA (siROR α -mt). Data are means \pm S.E. of three experiments, and are normalized to 18S rRNA. *P<0.05.

文献 10)より改変引用

ROR α を介する CLDND1 の発現調節に及ぼすロバスタチンの影響²¹⁾

ROR α は CLDND1 プロモーター領域の RORE へ直接結合することにより CLDND1 の転写調節に対し促進的に作用することが示された。ROR α は、既知のリガンドを持たないオーファン受容体と考えられてきた。近年、コレステロールおよびその誘導体であるオキシステロールなどのコレステロール類縁体が ROR α のリガンドとして特定されている^{22,23)}。しかし、ROR α 標的遺伝子である CLDND1 の転写調節に対するコレステロール類の影響は明らかにされていない。

脂質異常症の治療薬として用いられるスタチンは、コレステロール生合成経路の律速酵素である 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム A (HMG-CoA) レダクターゼを阻害する。さらに、スタチンは脳卒中発症の予防に効果的であることが証明されている^{24,25)}。しかし、総コレステロールの低下は脳出血のリスク増加との関連が示されている^{26,27)}。CLDND1 の発現低下は、脳卒中の中でも脳出血の原因である BBB の崩壊に関与していることが示されている⁹⁾。また、CLDND1 は ROR α 標的遺伝子であることから、CLDND1 の発現誘導に

ROR α リガンドとしてコレステロール類の関与が考えられる。そこで、ROR α を介した CLDND1 の発現調節に対するコレステロールの影響について検討した。

ROR α を介した CLDND1 の発現調節に対するコレステロールの関与を明らかにするために、ロバスタチンによりコレステロールを低下させた細胞中の CLDND1-RORE に対する ROR α 結合性について ChIP 法により検討した。ロバスタチン未処理における抗 ROR α 抗体を用いた免疫沈降量は、非免疫 IgG 抗体と比べて増加していた。それに対し、ロバスタチン処理細胞では、低下していることが示された(データ未掲載)。

CLDND1-RORE への ROR α 結合性に対するコレステロールの関与が示唆されたため、ロバスタチンによりコレステロールを低下させた細胞中の CLDND1-RORE に対する ROR α 応答性についてルシフェラーゼレポーター解析により検討した。ロバスタチン処理細胞におけるコントロールベクター (pSG5) と野生型 RORE の 3 回繰り返し配列を含むレポーター (pROREx3-wt) の応答性は、ロバスタチン未処理細胞と比べて、有意な低下を示した。この応答性の低下は、コレステロールの添加により有意に増加した。しかし、ロバスタチン未処理細胞までの応答性の回復は示さなかった(データ未掲載)。ロバスタチン処理によるコレステロールの合成阻害は、ROR α リガンドであるコレステロール量の減少により CLDND1-RORE に対して ROR α 結合性および応答性を抑制し、CLDND1 の転写活性化を抑制していることが示唆された。ロバスタチンによる ROR α 応答性の阻害は、コレステロール添加により一部回復したことから、コレステロールは ROR α を介した転写調節に直接関与していることが示唆された。しかし、ROR α の応答性は完全には回復せず、ロバスタチン未処理細胞における応答性と比べて、低い値を示した。ロバスタチンは、コレステロール合成経路の上流に位置する HMG-CoA レダクターゼを阻害することからその経路の下流にあるコレステロール以外の中間代謝物やコレステロール代謝物などの関与も考えられる。

CLDND1 発現レベルに対するロバスタチンの影響を明らかにするために、mRNA およびタンパク質レベルについて、それぞれ qRT-PCR およびウエスタンブロット法により検討した。ロバスタチン処理細胞における ROR α mRNA レベルは、未処理細胞と比べて、有意な変化を示さなかった。それに対し、CLDND1 mRNA レベルは、27.6%の有意な低下を示した(Figure 5)。次に、ROR α および CLDND1 タンパク質レベルをウエスタンブロットにより評価した。ロバスタチン処理細胞における ROR α タンパク質レベルは、未処理細胞と比べて、有意な変化を示さなかった。それに対し、CLDND1 のタンパク質レベルは、24.4%の有意な低下を示した(Figure 6)。これらの結果から、コレステロール類は、ROR α 発現レベルを調節しているのではなく CLDND1-RORE に対する ROR α 結合性に作用し、CLDND1 の転写を調節することが示唆された。

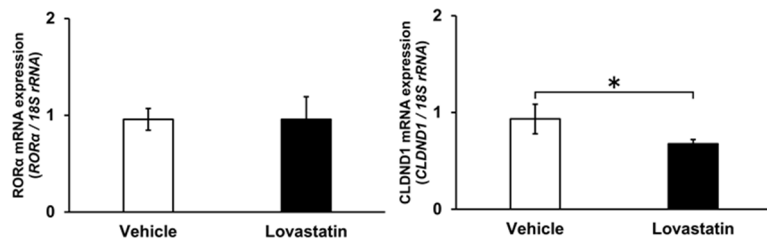


Figure 5. Expression level of CLDND1 mRNA with lovastatin addition in HepG2. HepG2 cells were treated with lovastatin or vehicle for 24 hours. mRNA expression of ROR α and CLDND1 were analyzed by qRT-PCR and normalized to 18S rRNA. Data are mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.05.

文献 21)より改変引用

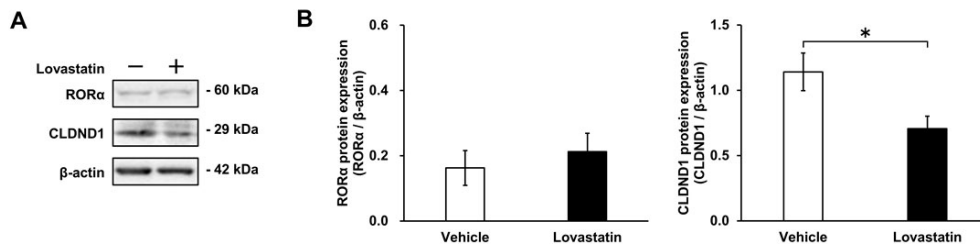


Figure 6. Expression level of CLDND1 protein with lovastatin addition in HepG2. (A) Representative blots of ROR α and CLDND1 protein expression in the HepG2 cells. (B) HepG2 cells were treated with lovastatin or vehicle for 72 hours. Protein expression of ROR α and CLDND1 was analyzed by immunoblotting and normalized to β -actin. Protein expression was quantified using the Intelligent Quantifier. Data are mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.05.

文献 21)より改変引用

CLDND1の発現調節に関する転写因子 MZF1の影響²⁸⁾

遺伝子の発現調節は、複数の転写因子による相互作用を受けることが報告されている²⁹⁾。そこで、ROR α およびコレステロール非依存的に CLDND1 タンパク質レベルまで影響を及ぼす新規転写因子について検討した。初めに、CLDND1 推定プロモーター領域を段階的に欠失することにより応答配列を評価した。ENCODE

データを用いたアセチル化ヒストンのクロマチン免疫沈降法および DNaseI感受性試験の結果より、第 1 イントロンを含む-308 から+891 の領域をヒト CLDND1 プロモーター領域であると推定した。しかし、CLDND1 イントロン領域に対する転写因子の影響は明らかにされていない。

そこで、第 1 イントロン領域の段階的な欠失変異によるルシフェラーゼレポーター解析により、応答性を検討した。その結果、第 1 イントロンにいくつかの潜在的なサイレンサー領域を特定し、中でも+529 から+568 領域は、CLDND1 の転写に対して最も抑制的に作用することが示唆された(データ未掲載)。サイレンサー領域に結合する転写因子を明らかにするために、*in silico* 解析および TFBIND ソフトウェアにより検討すると、サイレンサー領域は myeloid zinc finger 1 (MZFI) 結合配列であることが推定された。推定 MZFI 結合配列に対する MZFI の応答性を検討するために、野生型および変異型の MZFI 結合配列を含むレポーターベクター (pMZFI-Wt および pMZFI-Mt) を用いたルシフェラーゼレポーター解析により評価した。pMZFI-Mt は、pMZFI-Wt と比べて、約 1.2 倍の有意な応答性の増加を示した (Figure 7B)。MZFI 結合配列に対する MZFI 結合性を検討するために、MZFI を過剰発現させた HBEC を用いた ChIP 法により検討した。抗 MZFI 抗体を用いた免疫沈降量は、非免疫 IgG 抗体と比べて、約 2.8 倍の結合性を示した (Figure 7C)。CLDND1 転写に対する MZFI の関与をさらに特徴づけるために、推定 MZFI 結合配列への MZFI 応答性をルシフェラーゼレポーター解析により検討した。pMZFI-Wt と MZFI 発現ベクター (pMZFI) の共発現における応答性は、コントロールベクター (pSG5) と比べて、有意な増加を示した (データ未掲載)。それに対し、pMZFI-Wt と MZFI を標的とする siRNA (siMZFI) の共発現における応答性は、コントロール (siGFP) と比べて、有意な低下を示した (データ未掲載)。これらの結果は、MZFI がヒト CLDND1 の第 1 イントロンに存在するサイレンサー領域に結合し、予想に反してアクチベーターとして作用することが示唆された。

CLDND1 の転写に MZFI の関与が示されたため、MZFI 過剰発現とノックダウンにおける CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルをそれぞれ qRT-PCR およびウエスタンブロット法により評価した。過剰発現による MZFI 発現レベルの増加は、CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルを有意に増加させることを示した (Figure 8)。さらに、siRNA による MZFI レベルの抑制は、CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルの有意な減少を示した (Figure 9)。これらのことから、CLDND1 の転写調節は MZFI の発現レベルに依存していることが示唆された。

MZFI を介した CLDND1 発現調節の効果を評価するために、HBEC を用いた細胞間の物質透過性を *in vitro* 透過性試験により検討した。MZFI ノックダウン細胞は、コントロール細胞 (siGFP) と比べて、細胞間の物質透過性の亢進を示した (Figure 10)。これらの結果から、MZFI 発現レベルの抑制により CLDND1 転写活性化を抑制し、CLDND1 レベルの低下を通じた TJs の形成不全を引き起こす可能性が示された。したがって、

MZF1 は CLDND1 の転写調節に対してアクチベーターとして機能していることが示された。また、クローディングファミリーと同様に TJs を形成する膜タンパク質である N-カドヘリンの転写調節においても MZF1 の関与が報告されている^{30,31})。したがって、MZF1 の転写活性化は CLDND1 や N-カドヘリンなどの TJs 形成に関連するタンパク質の発現を亢進させ、TJs 形成を強固に保つことが考えられる。

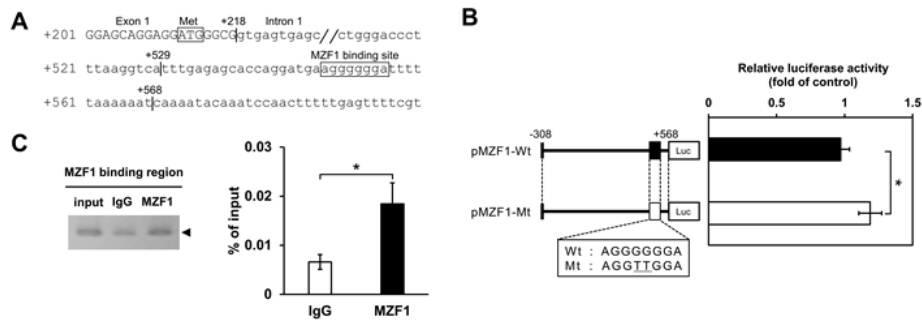


Figure 7. MZF1 responsiveness to the MZF1 binding site. (A) Schematic representation of the human CLDND1 promoter. Sequence analysis revealed the presence of a putative MZF1 binding site located at position +549 to +556 of the CLDND1 transcription start site (TSS,+1 to position). The exon region of human CLDND1 is capitalized, whereas the intron region is lowercased (Met, translational start codon). (B) The reporter plasmids pMZF1-Wt, containing the wild-type (AGGGGGGA), and pMZF1-Mt, containing the mutated-type (AGGTTGGA, mutated region is underlined), were engineered to contain a fragment of the human CLDND1 promoter region from -308 to +568. HBECs were transfected with luciferase under the control of the CLDND1 promoter. Data are mean \pm S.E. (n = 5). *P<0.01. (C) Binding between MZF1 and the MZF1 binding region of CLDND1 using ChIP-PCR (left). Results were quantified by PCR (right). HBECs were transfected with an MZF1 expression vector and a CLDND1 promoter (-308 to +891) containing an MZF1 binding region. Non-immune IgG and anti-MZF1 antibodies were used for immunoprecipitation. DNA occupancy levels are indicated as a percentage (%) of input. Data are mean \pm S.E. (n = 5). *P<0.05.

文献 28)より改変引用

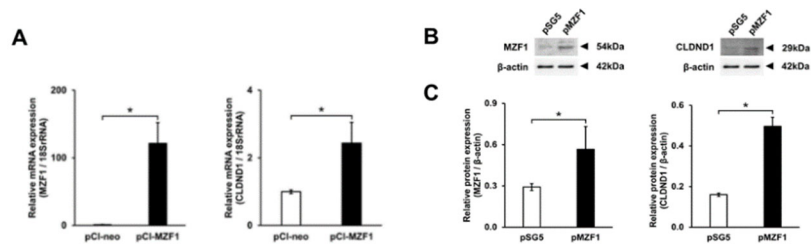


Figure 8. Expression level of CLDND1 with MZF1 overexpression in HBECS. (A) HBECS were transfected with an empty vector (pCl-neo) or an MZF1 expression vector (pCl-MZF1) for 72 hours. The expression levels of MZF1 and CLDND1 mRNA were analyzed by qRT-PCR and normalized to that of 18S rRNA. Data are mean \pm S.E. (n = 5). *P<0.01. (B) Representative immunoblots of MZF1 and CLDND1 protein expression in the HBECS. (C) HBECS were transfected with an empty vector (pSG5) or an MZF1 expression vector (pMZF1) for 48 hours. Protein expression of MZF1 and CLDND1 was analyzed by immunoblotting and normalized to that of β -actin. Protein expression was quantified using the Intelligent Quantifier. Data are mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.01.

文献 28)より改変引用

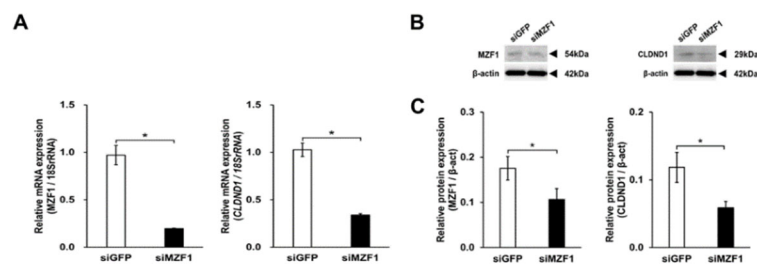


Figure 9. CLDND1 expression level upon MZF1 knockdown using siRNA in HBECS. HBECS were transfected with siGFP or siMZF1 for 48 hours. (A) The expression levels of MZF1 and CLDND1 mRNA were analyzed with qRT-PCR and normalized to that of 18S rRNA. Data are mean \pm S.E. (n = 5). *P<0.01. (B) Representative immunoblots of MZF1 and CLDND1 protein expression in the HBECS. (C) Protein expression of MZF1 and CLDND1 was analyzed with immunoblotting and normalized to that of β -actin. Protein expression was quantified using the Intelligent Quantifier. Data are mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.05.

文献 28)より改変引用

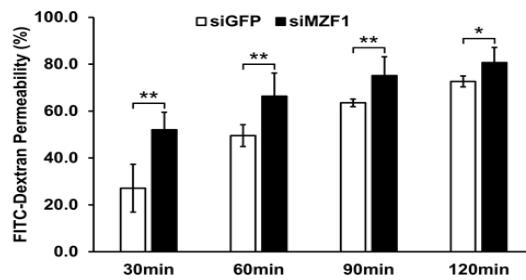


Figure 10. Permeability of FITC-dextran in MZF1 knockdown. HBECs were transfected with siGFP or siMZF1 for 48 hours. Effect of MZF1 knockdown on FITC-dextran permeability. Data are mean \pm S.E. (n = 6). *P<0.05, **P<0.01.

文献 28)より改変引用

CLDND1 プロモーター上流領域に対する MZF1 および SPI の相互作用³²⁾

MZF1 は CLDND1 第 1 イントロン領域のサイレンサーである MZF1 結合配列(+529 から+568)に結合し、CLDND1 の転写調節に対して促進的に作用することが示された。この領域はサイレンサーであるため、通常、生体内においてリプレッサーが結合し転写を抑制していることが考えられる。しかし、MZF1 を過剰発現させた結果、サイレンサーに結合しアクチベーターとして作用した。一般的に遺伝子の発現調節は、標的遺伝子の転写開始点よりも上流のプロモーター領域に転写因子が作用し、転写を調節している。そこで、CLDND1 プロモーター上流領域に作用し、転写を調節する転写因子について検討した。

CLDND1 の転写調節に対するプロモーター上流領域の影響を明らかにするために、応答性を示す領域を段階的な欠失によるルシフェラーゼレポーター解析により検討した。その結果、-742 から-734 領域がエンハンサーであり CLDND1 の転写に大きく影響することが推測された (Figure 11)。UCSC ゲノムブラウザーの ENCODE データによるアセチル化ヒストンのクロマチン免疫沈降法および DNase I 感受性試験の結果から、この領域に対する転写因子の反応性は低いことが示された (データ未掲載)。しかし、今回同定した-742 から-734 の領域はエンハンサーであり CLDND1 の転写に対して促進的に作用することが示唆された。in silico 解析により、プロモーター上流領域のエンハンサー (-742 から-734) に結合する転写因子として MZF1 および SPI を特定した。

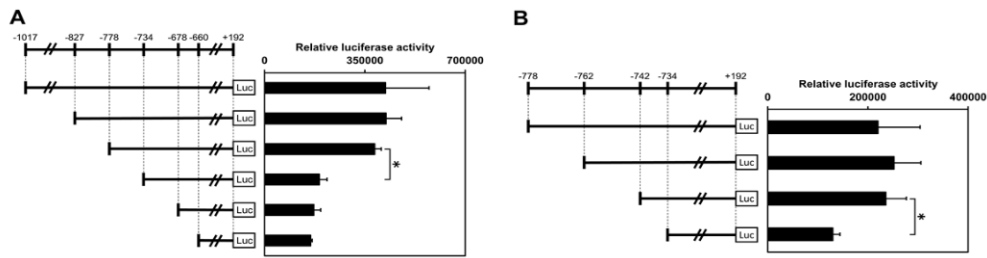


Figure 11. Transcriptional activity of the promoter region of human CLDND1. Human brain endothelial cells (HBECs) were transfected with luciferase vectors carrying stepwise deletion mutants of CLDND1 promoter region and evaluated for reporter activity. **(A)** Deletion mutants of -1017 to -660 regions from the region spanning -1017 to +192. **(B)** Deletion mutants of -778 to -734 regions from the region spanning -778 to +192. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 3). *P<0.05.

文献 32)より改変引用

エンハンサー領域に対する MZF1 および SP1 の応答性を検討するために、エンハンサーを含む (-742 から +192)あるいは欠失させた (-734 から+192)レポーターベクターをそれぞれ、コントロールベクター (pSG5)、MZF1 発現ベクター (pMZF1)あるいは SP1 発現ベクター (pSP1)と共発現し、ルシフェラーゼレポーター解析により評価した。エンハンサーを含む (-742 から+192)あるいは欠失させた (-734 から+192)領域に対する MZF1 の応答性は、コントロールと比べて、それぞれ約 2 倍および 1.5 倍の有意な増加を示した。また、エンハンサーを含む (-742 から+192)領域の応答性は、欠失させた (-734 から+192)領域と比べて、有意な低下を示した(データ未掲載 : Figure 12A; *p<0.05.)。それに対し、エンハンサーを含む-742 から+192 領域に対する SP1 の応答性は、コントロールと比べて、約 50%の有意な低下を示した。さらに、エンハンサーを欠失させた-734 から+192 領域の応答性は有意な変化を示さなかった (Figure 12C)。そこで、エンハンサーに対する MZF1 および SP1 の結合性を検討するために、MZF1 または SP1 を過剰発現させた HBEC を ChIP 法により評価した。抗 MZF1 抗体および抗 SP1 抗体による免疫沈降量は、非免疫 IgG 抗体と比べて、それぞれ 5.5 倍および 3.0 倍の結合性を示した (Figure 12B,D)。ルシフェラーゼレポーター解析および ChIP 法の結果より、CLDND1 プロモーター上流領域のエンハンサー (-742 から-734)に MZF1 または SP1 が結合すると CLDND1 の転写に対して、それぞれ促進的または抑制的に作用することが示唆された。

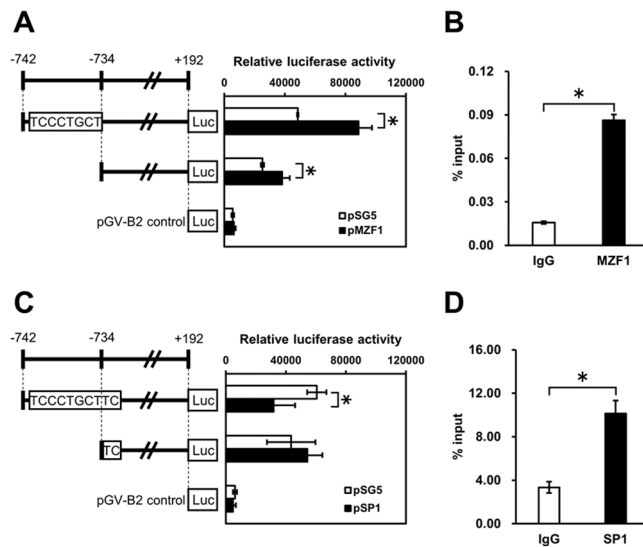


Figure 12. Evaluation of MZF1 and SP1 responsiveness to enhancer sequences in the CLDND1 promoter region. (A, C) Assessment of MZF1 and SP1 responsiveness to enhancer regions. Human brain endothelial cells (HBECs) were co-transfected with a luciferase reporter vector ligated from -742 to +192 regions or -734 to +192 regions with a MZF1-expressing vector (pMZF1) (A) or a SP1-expressing vector (pSP1) (C). Empty vectors (pGV-B2 and pSG5) were used as controls. The responsiveness of each transcription factor was evaluated by a reporter assay. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 3). *P<0.05. (B, D) Assessment of MZF1 and SP1 binding to enhancer regions. HBECs were co-transfected with a plasmid carrying the human CLDND1 promoter region (-1017 to +192) containing the enhancer with a pMZF1 (B) or pSP1 (D) vector. After 48 hours, the binding intensity of each transcription factor was evaluated by a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. Anti-MZF1, anti-SP1, and nonimmune IgG antibodies were used for immunoprecipitation. DNA occupancy levels are indicated as percentage (%) of input. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 6). *P<0.05.

文献 32)より引用

MZF1 および SP1 過剰発現における CLDND1 mRNA レベルを qRT-PCR により評価した。過剰発現による MZF1 mRNA レベルの増加は、CLDND1 mRNA レベルの有意な増加を示した。それに対し、過剰発現に

よる SP1 mRNA レベルの増加は、有意な変化を示さなかった(データ未掲載)。SP1 は、CLDND1 の転写レベルまで影響しないことから、MZF1 のエンハンサーに対する結合を競合的に阻害し、MZF1 による転写の促進作用を減弱させていることが考えられた。

プロモーター上流領域のエンハンサーおよび第 1 イントロン領域のサイレンサーに対して、MZF1 による転写調節の強さを比較するために、各 MZF1 結合配列の 3 回繰り返し配列を含むレポーターベクターを用いたルシフェラーゼレポーター解析により応答性を評価した。その結果、プロモーター上流領域のエンハンサーは、第 1 イントロン領域のサイレンサーと比べて、MZF1 に対する高い応答性を示した(Figure 13)。これらの結果から、過剰発現させた MZF1 は第 1 イントロンのサイレンサーと比べて、プロモーター上流のエンハンサーに対してアクチベーターとして強く作用していることが示唆された。

CLDND1 第 1 イントロンの MZF1 結合配列はサイレンサーであり、通常、リプレッサーが結合し、抑制的に働くことが考えられる。しかし MZF1 を過剰発現させると MZF1 がサイレンサーに結合し、アクチベーターとして作用する。それに対して、CLDND1 プロモーター上流の MZF1 結合配列はエンハンサーであり、通常の生体内において、アクチベーターである MZF1 が結合し、促進的に働くことが考えられる。以上の結果より、通常発現レベルとして存在する MZF1 は、CLDND1 プロモーター上流のエンハンサーに強く作用することで CLDND1 の転写を調節していることが示唆された。

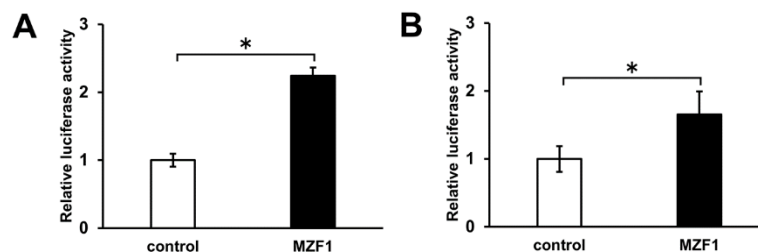


Figure 13. Comparison of MZF1-binding capacity to the promoter and first intron sites. Human brain endothelial cells (HBECs) were co-transfected with an empty vector or MZF1-expressing vector with a luciferase reporter plasmid containing the MZF1-binding sequence of the promoter site (A) or the first intron site (B) of CLDND1. The luciferase reporter plasmid contained three MZF1-binding sites to directly increase the responsiveness. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 4–5). *P<0.05.

文献 32)より改変引用

おわりに

脳血管内皮細胞における細胞接着分子 CLDN1 の低下は、TJs 形成不全による血管透過性の亢進を引き起こし、BBB の崩壊を通じて脳卒中を誘発することが考えられる⁹⁾。本総説において著者は、CLDN1 の発現調節機構および機能について検討し、細胞接着分子 CLDN1 に対する転写因子 ROR α および MZF1 の関与ならびにコレステロールを介した新規発現調節機構を解明した。低コレステロール血症は、脳血管内皮細胞膜中のコレステロール含量低下と共に転写因子 ROR α を介した CLDN1 の減少により、TJs 形成不全を引き起こし、脳内出血を誘起することが示唆された。また、転写因子 MZF1 の低下は、CLDN1 やカドヘリンの減少を生じ血管透過性亢進による BBB の崩壊を引き起こし、コレステロール非依存的脳出血を誘発することが考えられた。これらの知見は、BBB の血管透過性を制御することで脳卒中の治療や再発防止および脳に移行しにくい薬物に対する脳移行性改善への応用が期待される。

謝辞

本研究は、著者が福山大学大学院 薬学研究科 医療薬学専攻博士課程在学中に同大学 薬学部 病態生理・ゲノム機能学研究室 道原明宏教授の指導のもとに行った研究の成果をまとめたものである。本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、道原明宏教授、松岡浩史准教授、並びに病態生理・ゲノム機能学研究室の皆様にご心より深謝いたします。

利益相反

本研究に開示すべき利益相反関係はない。

参考文献

- 1) Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev.* 2010;64(2):328–63.
- 2) Hademenos GJ, Massoud TF. Biophysical mechanisms of stroke. *Stroke.* 1997;28(10):2067–77.
- 3) Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol.* 2015;209(4):493–506.
- 4) Claesson-Welsh L. Vascular permeability - The essentials. *Ups J Med Sci.* 2015;120(3):135–43.
- 5) Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1998;143(2):391–401.

- 6) Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 2011;585(4):606–12.
- 7) Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:403–29.
- 8) Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013;93(2):525–69.
- 9) Ohnishi M, Ochiai H, Matsuoka K, Akagi M, Nakayama Y, Shima A, et al. Claudin domain containing 1 contributing to endothelial cell adhesion decreases in presence of cerebellar hemorrhage. *J Neurosci Res.* 2017;95(10):2051–8.
- 10) Matsuoka H, Shima A, Uda A, Ezaki H, Michihara A. The retinoic acid receptor-related orphan receptor a positively regulates tight junction protein claudin domain-containing 1 mRNA expression in human brain endothelial cells. *J Biochem.* 2017;161(5):441–50.
- 11) Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 1994;8(5):538–53.
- 12) Vu-Dac N, Gervois P, Grötzinger T, De Vos P, Schoonjans K, Fruchart JC, et al. Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor ROR α . *J Biol Chem.* 1997;272(36):22401–4.
- 13) Raspé E, Duez H, Gervois P, Fiévet C, Fruchart JC, Besnard S, et al. Transcriptional Regulation of Apolipoprotein C-III Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor ROR α . *J Biol Chem.* 2001;276(4):2865–71.
- 14) Genoux A, Dehondt H, Helleboid-Chapman A, Duhem C, Hum DW, Martin G, et al. Transcriptional regulation of apolipoprotein A5 gene expression by the nuclear receptor ROR α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1186–92.
- 15) Matsuoka H, Shima A, Kuramoto D, Kikumoto D, Matsui T, Michihara A. Phosphoenolpyruvate carboxykinase, a key enzyme that controls blood glucose, is a target of retinoic acid receptor-related orphan receptor α . *PLoS One* [Internet]. 2015;10(9):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137955>

- 16) Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, et al. Disruption of the nuclear hormone receptor ROR α in staggerer mice. *Nature*. 1996;379(6567):736–9.
- 17) Harding HP, Atkins GB, Jaffe AB, Seo WJ, Lazar MA. Transcriptional activation and repression by ROR α , an orphan nuclear receptor required for cerebellar development. *Mol Endocrinol*. 1997;11(11):1737–46.
- 18) Ryutaro Matsumura TS. Identification of Cerebral Infarction-Specific Antibody Markers from Autoantibodies Detected in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Mol Biomark Diagn*. 2015;6(2).
- 19) Miki N, Ikuta M, Matsui T. Hypoxia-induced Activation of the Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor $\alpha 4$ Gene by an Interaction between Hypoxia-inducible Factor-1 and Sp1. *J Biol Chem*. 2004;279(15):15025–31.
- 20) Kim EJ, Yoo YG, Yang WK, Lim YS, Na TY, Lee IK, et al. Transcriptional activation of HIF-1 by ROR α and its role in hypoxia signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(10):1796–802.
- 21) Shima A, Matsuoka H, Miya K, Michihara A. Lovastatin Suppresses the Transcriptional Regulation of CLDN1 in Human Hepatoma Cells. *BPB Reports*. 2020;3(4):113–8.
- 22) Kallen JA, Schlaeppli JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, et al. X-ray structure of the hROR α LBD at 1.63 Å: Structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of ROR α . *Structure*. 2002;10(12):1697–707.
- 23) Kallen J, Schlaeppli JM, Bitsch F, Delhon I, Fournier B. Crystal Structure of the Human ROR α Ligand Binding Domain in Complex with Cholesterol Sulfate at 2.2 Å. *J Biol Chem*. 2004;279(14):14033–8.
- 24) Di Mascio R, Marchioli R, Tognoni G. Cholesterol reduction and stroke occurrence: An overview of randomized clinical trials. *Cerebrovasc Dis*. 2000;10(2):85–92.
- 25) Bucher HC, Griffith LE, Guyatt GH. Effect of HMGcoA reductase inhibitors on stroke: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med*. 1998;128(2):89–95.
- 26) Goldstein LB, Amarenco P, Szarek M, Callahan A, Hennerici M, Sillesen H, et al. Hemorrhagic stroke in the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels study. *Neurology*. 2008;70(24):2364–70.

- 27) Tirschwell DL, Smith NL, Heckbert SR, Lemaitre RN, Longstreth WT, Psaty BM. Association of cholesterol with stroke risk varies in stroke subtypes and patient subgroups. *Neurology*. 2004;63(10):1868–75.
- 28) Shima A, Matsuoka H, Yamaoka A, Michihara A. Transcription of CLDN1 in human brain endothelial cells is regulated by the myeloid zinc finger protein 1. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2020;
- 29) De La Brousse FC, McKnight SL. Glimpses of allosteric control of eukaryotic gene expression. *Trends Genet*. 1993;9(5):151–4.
- 30) Ko H, Kim S, Yang K, Kim K. Phosphorylation-dependent stabilization of MZF1 upregulates N-cadherin expression during protein kinase CK2-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis* [Internet]. 2018;7(3):27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41389-018-0035-9>
- 31) Perrotti D, Melotti P, Skorski T, Casella I, Peschle C, Calabretta B. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myc promoter activity. *Mol Cell Biol*. 1995;15(11):6075–87.
- 32) Shima A, Matsuoka H, Hamashima T, Yamaoka A, Koga Y, Michihara A. Transcription of CLDN1 is Regulated Mainly by the Competitive Action of MZF1 and SP1 that Binds to the Enhancer of the Promoter Region. *BPB Reports*. 2020;3(6):190–5.