

小脳出血時における内皮細胞接着因子 CLDND1 の減少

大西 正俊、落合 博之、松岡 晃平、赤木 茉莉奈、
中山 雄大、志摩 亜季保、宇田 有沙、松岡 浩史、
上敷領 淳、道原 明宏、井上 敦子

Journal of Neuroscience Research, **95**, 2051-58 (2017)

Claudin domain containing 1 contributing to endothelial cell adhesion decreases in presence of cerebellar hemorrhage

Masatoshi Ohnishi, Hiroyuki Ochiai, Kohei Matsuoka, Marina Akagi,
Yuta Nakayama, Akiho Shima, Arisa Uda, Hiroshi Matsuoka,
Jun Kamishikiryo, Akihiro Michihara, Atsuko Inoue

ABSTRACT: The claudin family comprises 4-pass transmembrane proteins involved in the formation of tight junctions (TJs). Relatively recently, claudin domain containing (CLDND) 1, also known as claudin-25, was identified as a novel member of the claudin family. In the present study, we revealed that in the adult murine brain, CLDND1 is abundant in the cerebellum among common sites of intracerebral hemorrhage. Thus, the dynamics of CLDND1 after cerebellar hemorrhage were examined. Both CLDND1 mRNA and protein levels transiently decreased at 24 h after hemorrhagic insult. For immunostaining, an anti-CLDND1 antibody that recognizes the specific epitope in the extracellular first loop was prepared. Dual immunohistochemical staining with CD31 using coronal cryosections of intact murine cerebellum tissue revealed that CLDND1 is expressed on endothelial cells. We therefore performed an *in vitro* permeability test using a human brain endothelial cell (HBEC) line to reveal whether CLDND1 contributes to cell adhesion like other claudins. CLDND1 was expressed on HBECs as well as in murine cerebellum tissue, and a strong signal was observed at TJs. RNA interference against CLDND1 decreased both the mRNA and protein levels without cytotoxicity. The permeability to small molecules, but not to large ones, across confluent HBECs increased on CLDND1 knock-down compared with mock-treated cells. These results suggest that the transient decrease of CLDND1 after cerebellar hemorrhage is responsible for low-molecular-weight-selective vascular hyperpermeability.

抄録 クローディンファミリーは一般に細胞接着に関与し、中枢では主に claudin-5 が血液脳関門におけるタイトジャンクションの形成に寄与している。しかしながら、血液脳関門の機能には claudin-5 のみでは説明がつかない点も残されており、他のクローディンの関与を示唆する報告が散見される。一方で claudin domain containing (CLDND)1 は、

比較的最近同定された新規のクローディングファミリーであり、claudin-25 としても知られる。本研究において脳出血好発部位（線条体、視床、大脳皮質および小脳）における CLDND1 の発現分布を調べた結果、mRNA、タンパク質ともに小脳で最も強い発現が認められた。したがって、CLDND1 は特に小脳においてその役割を担う可能性があるため、マウス小脳出血モデルを作成し、CLDND1 の動態を解析した。小脳出血 24 時間後において、CLDND1 は mRNA、タンパク質ともに有意に減少した。血液脳関門への影響の有無を調べるため、小脳切片を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、CLDND1 は血管内皮細胞に局在することが明らかになった。Human brain endothelial cell (HBEC) 細胞株においてもその膜に CLDND1 の発現が認められたため、CLDND1 が細胞接着に関与するかどうか *in vitro* で透過性試験を行った。CLDND1 をノックダウンした HBEC は、コントロール siRNA を導入した細胞に比べて、透過性が有意に上昇した。これらの結果から、小脳出血後における CLDND1 の減少は、脳血管透過性の亢進に寄与することが示唆された。