

ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子クローディンの発現調節機構に関する研究

福山大学大学院 薬学研究科 医療薬学専攻
博士課程 4 年 志摩 亜季保

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。血液と脳組織間の物質移動を制御する血液脳関門 (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) によりバリア機能を担っている。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。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。これらのことから、CLDND1 の発現低下は、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、本研究においては CLDND1 の発現調節機構および機能についての解明を試みた。

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

脳卒中発症に影響を与える動脈硬化症、脂質代謝異常、虚血で誘導される血管新生などに関与している核内受容体 Retinoic acid receptor - related orphan receptor α (ROR α) による CLDND1 の転写調節について検討した。その結果、ROR α が CLDND1 プロモーター領域のエンハンサーである ROR 応答配列 (RORE) に直接結合し、アクチベーターとして CLDND1 の転写調節に関与していることを明らかにした。

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

ROR α リガンドであるコレステロールによる CLDND1 発現調節についてコレステロール低下薬であるロバスタチンを用いて検討した。その結果、ロバスタチンによるコレステロール類の低下が CLDND1 プロモーター領域に存在する RORE への ROR α 結合性および CLDND1 の発現調節に対して抑制的に作用することを明らかにした。

CLDND1 の発現調節に関与する転写因子 MZF1 の影響

遺伝子の発現調節は複数の転写因子の相互作用により影響を受けることが知られている。そこで、新規転写因子の関与について検討した。その結果、転写因子 Myeloid zinc finger 1 (MZF1) が CLDND1 第 1 イントロン領域のサイレンサーである MZF1 結合配列に結合し、アクチベーターとして CLDND1 の発現調節に関与していることを明らかにした。この領域はサイレンサーであることから、通常、生体内においてリプレッサーによる影響が強いと考えられる。さらに、MZF1 の発現低下が細胞間の物質透過性を亢進させることも明らかにした。

CLDND1 プロモーター上流領域に対する MZF1 および SP1 の相互作用

一般的に遺伝子の発現調節は、プロモーター上流領域に転写因子が作用し、調節することから、CLDND1 のプロモーター上流領域について検討した。その結果、プロモーター上流領域のエンハンサーに対して MZF1 と Specificity protein 1 (SP1) が相互作用しアクチベーターである MZF1 の働きにより CLDND1 の発現を増加させることを明らかにした。

以上の結果から、細胞接着分子 CLDND1 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が解明された(Fig.1)。

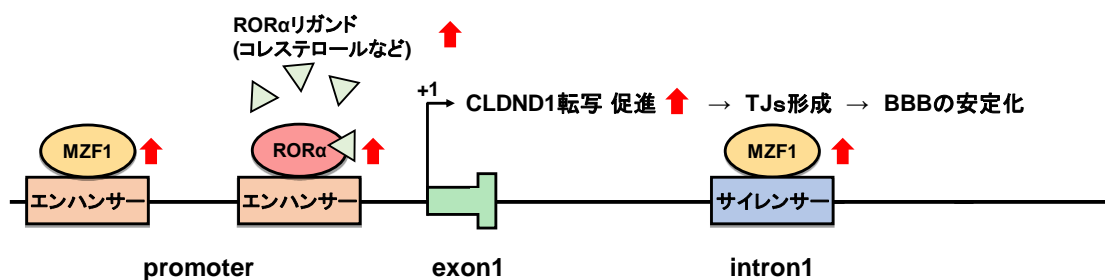


Fig.1 BBBの安定化に対するCLDND1発現調節機構

【発表論文】

1. Matsuoka H., **Shima A.**, Uda A., Ezaki H. and Michihara A., The retinoic acid receptor-related orphan receptor α positively regulates tight junction protein claudin domain-containing 1 mRNA expression in human brain endothelial cells. *J. Biochem.*, **161**, 441-450 (2017).
2. **Shima A.**, Matsuoka H., Miya K. and Michihara A., Lovastatin suppresses the transcriptional regulation of CLDND1 in human hepatoma cells. *BPB Reports*, **3**, 113-118 (2020).
3. **Shima A.**, Matsuoka H., Yamaoka A. and Michihara A., Transcription of CLDND1 in human brain endothelial cells is regulated by the myeloid zinc finger 1. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, doi: 10.1111/1440-1681.13416 (2020).
4. **Shima A.**, Matsuoka H., Hamashima T., Yamaoka A., Koga Y. and Michihara A., Transcription of CLDND1 is Regulated Mainly by the Competitive Action of MZF1 and SP1 that Binds to the Enhancer of the Promoter Region. *BPB Reports*, **3**, 190-195 (2020).

【参考論文】

1. Matsuoka H., **Shima A.**, Kuramoto D., Kikumoto D., Matsui T. and Michihara A., *PLoS One*, **10**, 1-11 (2015).
2. Michihara A., **Shima A.**, Matsuoka H., Mizutani Y., Uda A., Mido M., Oda A., Ezaki H. and Uchino U., *Jpn. J. Soc. Pharm.*, **36**, 27-35 (2017).
3. Ohnishi M., Ochiai H., Matsuoka K., Akagi M., Nakayama Y., **Shima A.**, Uda A., Matsuoka H., Kamishikiryo J., Michihara A. and Inoue A., *J. Neurosci. Res.*, **95**, 2051-2058 (2017).
4. Matsuoka H., Tamura A., Kinehara M., **Shima A.**, Uda A., Tahara H. and Michihara A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **498**, 817-823 (2018).
5. Matsuoka H., Tokunaga R., Katayama M., Hosoda Y., Miya K., Sumi K., Ohishi A., Kamishikiryo J., **Shima A.** and Michihara A., *BMC Mol. Cell Biol.*, **21**, doi: 10.1186/s12860-020-00276-z (2020).
6. Matsuoka H., Katayama M., Ohishi A., Kamishikiryo J., Miya K., Tokunaga R., Kobayashi S., Nishimoto Y., Hirooka K., **Shima A.** and Michihara A., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1-13 (2020).

【学会発表】

1. 第135回日本薬学会 年会(神戸), 28PB-am119, ポスター発表, 2015年3月
2. 第54回日本薬学会 中国四国支部学術大会(高知), 31B-09-20, 口頭発表, 2015年10月
3. 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会合同大会(神戸), 2P-0651, ポスター発表, 2017年12月
4. 第41回日本分子生物学会年会(横浜), 3P-0008, ポスター発表, 2018年11月
5. 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会(高松), 9D-11-00, 口頭発表, 2019年11月
6. 第56回高血圧関連疾患モデル学会学術総会(東京), O-2-6, 口頭発表, 2020年12月

学位審査報告書

学位申請者 志摩 亜希保

学位論文題目 ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子クローディン発現
調節機構に関する研究

論文審査委員

主査 竹田 修三

副主査 佐藤 雄己

副主査 井上 敦子

論文審査及び試験の結果の要旨

血液脳関門(blood brain barrier: BBB)の機能破綻は、脳卒中の発症および悪化に
関与している。そこで BBB 構築に関わるクローディン D1 (CLDND1)の発現制御機構及び
機能の解明のため、次の4項目の研究が行われた。

1. CLDND1 の転写調節に関与する転写因子 ROR \cdot の同定
2. ROR \cdot を介する CLDND1 の発現調節に及ぼすロバスタチンの影響
3. CLDND1 の発現調節に関与する転写因子 MZF1 の影響
4. CLDND1 プロモーター上流領域である MZF1 及び SP1 の相互作用

その結果、本論文は、細胞接着分子 CLDND1 の発現調節における転写因子として ROR \cdot
及び MZF1 の関与を明らかにし、コレステロール依存的かつ非依存的な新規発現調節機
構を明確に示した。CLDND1 の発現低下は密着結合の形成不全を来す可能性があり、
ここに得られた一連の成果は脳内出血をはじめとする脳卒中の予防戦略を考える上
でも示唆に富むものと考えられる。従って、今後の研究の発展を十分に期待できる優れた
研究成果として高く評価できる。

本学位請求論文は、福山大学薬学研究科指導教員により必要な論文指導を受けた後に
提出されたものであり、本研究科学位授与規程に従い、審査委員会全員による審査に合
格した。従って、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと判定する。

以 上