

博士(薬学) 学位論文

ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子
クロロデインの発現調節機構に関する研究

2021 年 3 月

福山大学大学院 薬学研究科

医療薬学専攻 博士課程

志摩 亜季保

目次

緒論.....	1
第 1 章 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	
第 1 節 序論.....	5
第 2 節 実験方法.....	6
第 3 節 結果.....	11
第 4 節 考察.....	23
第 5 節 小括.....	24
第 2 章 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	
第 1 節 序論.....	25
第 2 節 実験方法.....	26
第 3 節 結果.....	29
第 4 節 考察.....	35
第 5 節 小括.....	37
第 3 章 細胞接着分子 CLDND1 の発現調節に関与する転写因子 MZF1 の影響	
第 1 節 序論.....	38
第 2 節 実験方法.....	39
第 3 節 結果.....	42
第 4 節 考察.....	52
第 5 節 小括.....	54
第 4 章 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	
第 1 節 序論.....	55
第 2 節 実験方法.....	56
第 3 節 結果.....	58
第 4 節 考察.....	66
第 5 節 小括.....	68
総括.....	69
謝辞.....	71
引用文献.....	72
論文目録.....	78
参考文献.....	79

略語一覧

AHR	: Aryl Hydrocarbon Receptor
AJs	: Adherens junctions
BBB	: blood brain barrier
CDH	: Cadherin
ChIP	: Chromatin immunoprecipitation assay
CLDN	: Claudin
CLDND1	: Claudin domain containing 1
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EMSA	: Electrophoresis mobility shift assay
HBEC	: human brain endothelial cell
HEK293	: human embryonic kidney 293 cell
HeLa	: human cervix malignant epithelial cell
HepG2	: human hepatoma cell
HMG-CoA	: hydroxymethylglutaryl-CoA
MPD	: Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase
MZF1	: Myeloid Zinc finger 1
OCLN	: Occludin
qRT-PCR	: Quantitative reverse transcription-PCR
ROR α	: Retinoic acid receptor-related orphan receptor α
RORE	: ROR response element
SP1	: Specificity protein 1
TJs	: Tight junctions
TSS	: Transcription start site
ZO-1	: Zonula occludens proteins

緒論

脳卒中は脳血管の閉塞(脳梗塞：脳卒中患者の約 76%以上)または破裂(脳出血：脳卒中患者の約 18%、くも膜下出血：脳卒中患者の約 7%)により急激な意識障害や神経症状を呈する疾患である。また、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。脳卒中の危険因子として、高血圧、糖尿病、脂質異常症、心房細動などの基礎疾患が報告されている¹。中でも、高血圧は極めて強い危険因子である。また、疫学調査の結果、血中コレステロールの増加および低下は、それぞれ脳梗塞および脳内出血の発症に関与していることが報告されている²⁻⁵。

我が国における脳卒中の死亡率は、医療技術の進歩や食生活の改善に伴い低下してきた⁶⁻⁹。しかし、生活習慣病や動脈硬化症患者の増加に加え、脳卒中を多く発症する高齢者人口の増加により、脳卒中罹患者数は今後増加すると懸念されている¹⁰。脳卒中は、寝たきりや認知症発症の原因疾患として各患者総数の約 25%および 20%を占めている^{11,12}。脳卒中の再発や後遺症による長期的な治療や介護から、2017 年の脳卒中に関連する国民医療費は1兆 8000 億円以上であった¹³。これらのことから、脳卒中の発症は、患者だけでなく、家族や国の財政・経済に対しても負担が大きい疾患であると考えられる。

血液脳関門(blood brain barrier：BBB)は、脳組織内の血液内腔側から、血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトにより構成され、血液と脳組織間における物質移動を強固に制御している(Figure 1)¹⁴。BBB の破綻は、脳卒中の発症および悪化に関与している¹⁵。細胞間の接着は、頂端側から密着結合(Tight junctions：TJs)、接着結合(Adherens junctions：AJs)、デスモソーム、ギャップ結合(Gap junction)に分類される。BBB の血管内皮細胞において TJs と AJs は、物質透過性の制御ならびにバリア機能に重要な役割を担っている¹⁶⁻¹⁸。TJs および AJs は、それぞれ接着分子であるクローディン(Claudin：CLDN)、オクルディン(Occludin：OCLN)およびカドヘリン(Cadherin：CDH)により形成されている。CLDN と OCLN および CDH は、それぞれ ZO タンパク質(Zonula occludens proteins：ZO-1)およびカテニンを介してアクチンと結合し細胞間結合を増強している(Figure 2)。CLDN 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 (Figure 3)¹⁹⁻²¹。ヒトにおいて CLDN 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る²²。CLDN25(別名 : Claudin domain containing 1 [CLDND1])は、他の CLDN と高い相同性を示し、過剰発現により TJs および細胞質に局在することが報告されている²⁰。共同研究者の大西らは、コラゲナーゼ処理により脳出血を誘発させたマウスの脳出血部位において CLDND1 タンパク質レベルの低下ならびにヒト血管内皮細胞(human brain endothelial cells : HBECS)中の CLDND1 ノックダウン(低下)による物質透過性の亢進を報告している²³。また、松岡らは CLDND1 の翻訳抑制を生じるマイクロ RNA(miR-124)の増加が脳卒中易発症ラット(SHRSP)の小脳出血阻害に関与していることを報告した²⁴。さらに、TJs の脆弱化による血管内皮細胞の物質透過性亢進は血管浮腫を引き起こし、脳卒中を発症する可能性が示されている¹⁶。よって、CLDND1 低下による TJs の脆弱化は、血管透過性亢進を引き起こし、脳卒中を生じることが推測される。その他、カテニン-ノックアウト上皮細胞(EpH14)により生じる形質膜中の CLDN3 とコレステロールの低下は、コレステロールの添加により、TJs の形成が正常化(修復・回復)された²⁵。つまり、コレステロールは CLDN を含む TJs の制御に関与していることが示唆された。しかし、TJs 関連遺伝子に及ぼすコレステロールの影響については不明な点が残っている。CLDND1 の発現調節機構を明らかにし、血管透過性の制御に活用できれば、脳出血の治療や再発予防に役立つことが考えられる。

そこで、本研究においては CLDND1 の発現調節に関わる新規メカニズムの解明を試みた。第 1 章では、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。第 2 章では、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。第 3 章では、CLDND1 の発現調節に関わる第 1 イントロンに着目し、転写因子 Myeloid Zinc finger 1(MZF1)の関与について検討した。第 4 章では、CLDND1 プロモーター上流領域に着目し、MZF1 と Specificity protein 1(SP1)の相互作用について検討した。

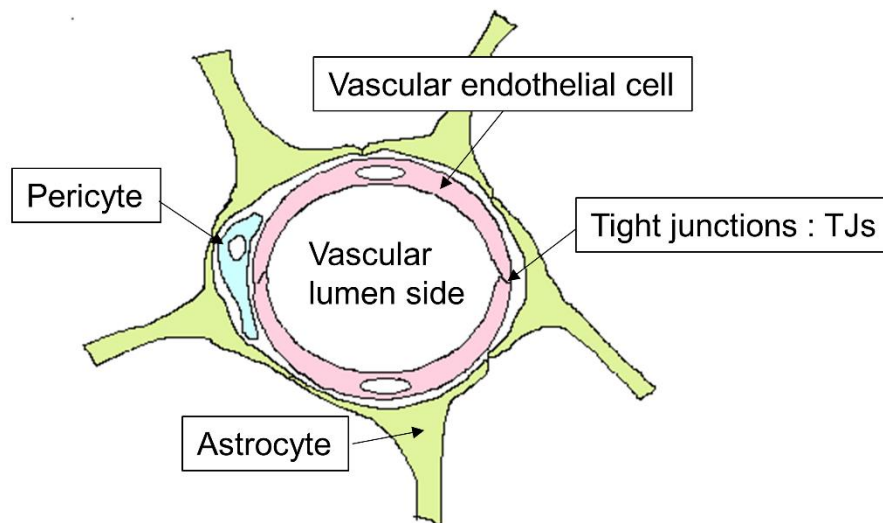


Figure 1. Cellular constituents of the Blood Brain Barrier.

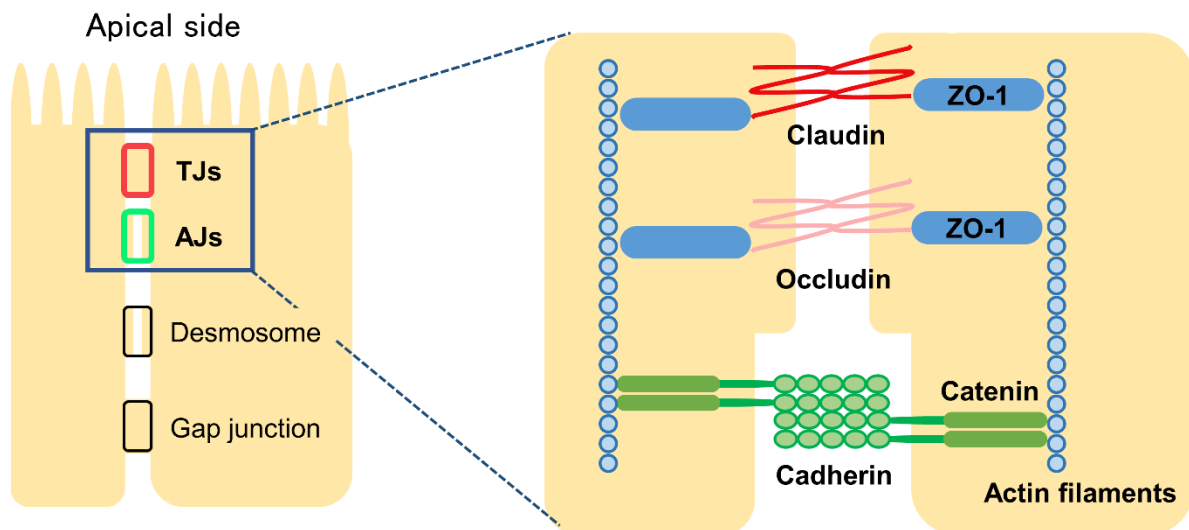


Figure 2. Molecular composition of TJs and AJs of endothelial cells.

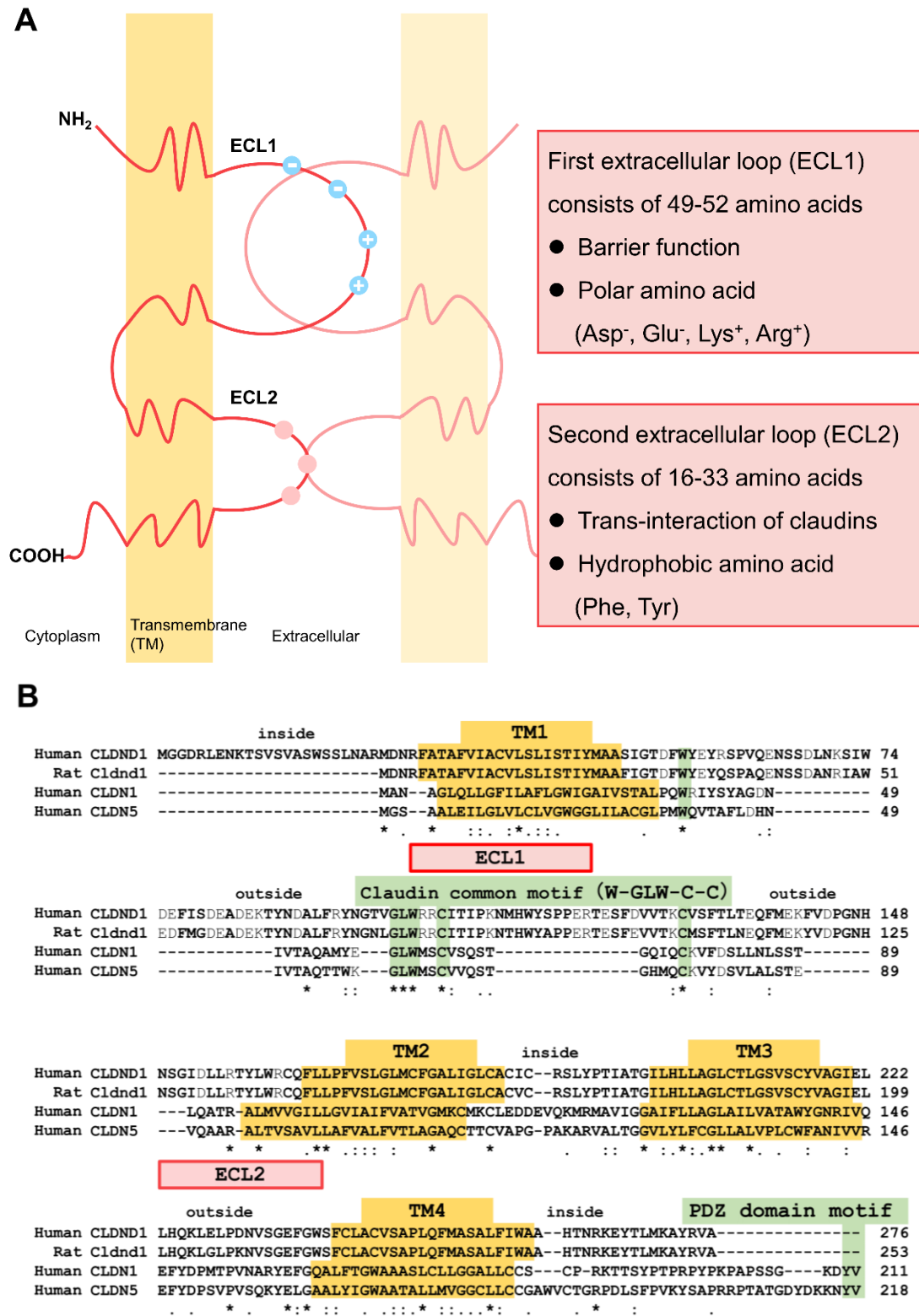


Figure 3. Structure of claudin family. (A) Schematic representation of claudins. (B) Comparison of amino acid sequences between human CLDND1 and rat Cldnd1, human CLDN1 and human CLDN5.

第 1 章 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

第1節 序論

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、A / T リッチな配列に続く RGGTCA (R : A または G) のコンセンサス配列から構成される 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²⁶。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。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^{27,28}。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 と Glucose-6-phosphatase) が報告されている²⁹⁻³³。一方、動脈硬化の進行により、細胞接着分子 CLDND1 に対する抗体は血中において増加することが示されている³⁴。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。そこで、本章においては CLDND1 の転写調節機構を明らかにするために ROR α の関与について検討した。初めに、CLDND1 中に存在する RORE の同定を行った。次に、CLDND1 と ROR α のラット組織およびヒト培養細胞における mRNA 量の相関性を評価した。加えて、ROR α 過剰発現細胞株およびノックダウンにおける CLDND1 mRNA レベルの変化を評価した。さらに、ROR α と RORE の結合性および応答性を評価した。

第2節 実験方法

第1項 実験動物

9-10 週齢の WKY / Izm 雄ラットを日本疾患モデル共同研究協会より入手した。実験プロトコルは、福山大学研究安全倫理委員会(動物実験安全倫理部会)によって承認され、文部科学省による動物の管理と使用に関するガイドラインに準拠して行った。入手 3 日後のラットに、ペントバルビタール(100 mg/kg)を腹腔内注射し屠殺後、脳、肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓および精巣を採取した。

第2項 細胞培養

全ての細胞は、American Type Culture Collection から入手した。ヒト脳血管内皮細胞(human brain endothelial cell : HBEC)、ヒト胎児腎細胞(human embryonic kidney 293 cell : HEK293)、ヒト肝癌由来細胞(human hepatoma cell : HepG2)およびヒト子宮頸癌由来細胞(human cervix malignant epithelial cell : HeLa)は、10% ウシ胎児血清(血清)と 100 μ g/mL ペニシリン-ストレプトマイシン(抗生物質)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、37°C、CO₂ 分圧 5%で培養した。

mRNA 量の相関性評価に用いた HBEC、HEK293、HepG2 および HeLa は、 1×10^5 cell/well で播種し、48 時間培養した。

コバルト処理(疑似低酸素条件)における mRNA レベルの評価に用いた HBEC は、 1×10^5 cell/well で播種し、24 時間培養した。血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換後、300 μ M 塩化コバルトを添加し、0、6、12 および 18 時間培養した。

第3項 ROR α 安定発現細胞株(安定発現株)の作成と対照実験

薬剤選択用のゼオシン耐性遺伝子を含む ROR α 発現ベクター(pROR α -zeo)は、psiRNA-h7SK GFPzeo(InvivoGen)を HindIII および Alw44 I で処理後、ROR α 発現ベクター(pROR α)の Pvu I 部位に T4 DNA リガーゼ(Takara Bio)を用いて挿入することにより調製した。HBEC を 1×10^5 cell/well で播種し、一晩培養後、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換した。pROR α -zeo は Lipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)を用いてトランスフェクションした。その後 100 μ g/mL ゼオシンを含

む DMEM で培養し ROR α を安定発現する HBEC (ROR α -St1、ROR α -St2) を獲得した。mRNA の発現を評価するために用いた安定発現株と対照株 (HBEC) は、 1×10^5 cell/well で播種し、48 時間培養した。

第4項 RNA の抽出

第 1 項で採取した組織 (10 mg) は、バイオマッシャー (Nippi) を用いて破碎し、ISOGEN 試薬 (Nippon Gene) により total RNA を抽出した。第2および3項で培養した各細胞は、PBS (-) で 2 回洗浄し、ISOGEN 試薬を用いて total RNA を抽出した。濃度と純度は、SmartSpec Plus スペクトロフォトメーター (Bio-Rad Laboratories) により算出した。

第5項 定量的逆転写 PCR 法 (Quantitative reverse transcription-PCR : qRT-PCR)

cDNA を合成するために、300 ng total RNA を含む反応液 (最終濃度 : 25 mM Tris-HCl [pH 7.8]、37.5 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、5 pmol/mL オリゴ dT プライマー [Takara Bio]、0.5 mM dNTP [Applied Biosystems]、10 mM DTT、0.4 U RNase 阻害剤 [Takara Bio] および 6 U Moloney murine leukemia virus 逆転写酵素 [Thermo Fisher Scientific]) を 25°C で 10 分間、37°C で 90 分間、70°C で 5 分間反応させた。qRT-PCR は、SYBR Green Real-Time PCR マスターミックス (TOYOBO) と 1 μ M プライマーを用いて反応 (12 μ l) をさせた。PCR 反応は、Roche LightCycler (Roche) を用いて、95°C で 2 分間の初期変性後、3 段階反応 (熱変性 [95°C で 10 秒間]、アニーリング [56°C で 10 秒間]、伸長反応 [72°C で 15 秒間]) を 40 サイクル行った。Table 1 に示すように、ROR α 、CLDN1、Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) および β -actin 遺伝子のプライマーは、ヒトおよびラット間共通のエクソン領域に設計し、タイトジャンクションタンパク質 1 (TJP1、別名 : ZO-1)、E-カドヘリン (CDH1)、オクルディン (OCLN) および 18S rRNA 遺伝子のプライマーは、ヒトのエクソン領域に設計した。設計したプライマー配列は、UCSC ゲノムブラウザー上の BLAT により検索し³⁵、目的の遺伝子に対する特異的な配列であることを確認した。遺伝子発現の補正は、 β -actin および 18S rRNA 遺伝子を内部標準として用い、

LightCycler ソフトウェア (Roche) により定量化した。

第6項 mRNA 量の測定 (絶対定量法)

ラット組織およびヒト培養細胞間における各遺伝子の mRNA 量は、qRT-PCR を行い、増幅した PCR 産物を精製後、検量線を作成し算出した。qRT-PCR は、第 5 項と同様の操作で行い、増幅した PCR 産物を精製後、SmartSpec Plus スペクトロフォトメーター (Bio-Rad Laboratories) により濃度を算出し、10 倍希釈系列サンプル (10-0.0001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を標準試料とした。標準試料を用いた qRT-PCR による C_p 値とサンプル濃度をプロットし回帰直線を求めることで検量線を作成した。

第 5 項で合成した cDNA 1 μl (total RNA 10 ng) を用いて qRT-PCR を行い、各遺伝子の mRNA 量を検量線から算出した。その後、ラット組織およびヒト培養細胞の mRNA 量は、それぞれ組織 1 mg および total RNA 1 μg あたりの mRNA 量 (μg) として換算した。

第7項 ルシフェラーゼレポーターベクターの構築

ヒトにおける CLDND1 遺伝子のプロモーター領域 (GenBank accession no. NM_001040181 : 転写開始点 (TSS) を +1 として、上流 -303 から下流 +1720) に存在する RORE の野生型および変異型を含むレポータープラスミド (pCLDND1-wt および pCLDND1-mt) は、HBEC のゲノム DNA から Table 1 に示すプライマーを用いて PCR により増幅した。その PCR 産物を Mlu I / Sal I で処理し、pGVB2 ベクター (Toyo Ink) のルシフェラーゼ遺伝子上流の Mlu I / Xho I 部位に挿入することにより調製した。また、野生型 RORE の 1-3 回繰り返し配列を含むレポーターベクター (pROREx1、x2 または x3-wt) および変異型 RORE の 3 回繰り返し配列を含むレポーターベクター (pROREx3-mt) は、RORE のセンス鎖およびアンチセンス鎖として Table 1 に示す相補的なオリゴヌクレオチドを T4 Polynucleotide Kinase (Takara Bio) でリン酸化し、アニーリング後、SV40 プロモーターを含む pGVP2 ベクターの Sma I 部位に挿入することにより調製した。得られた各種レポーターベクターは、pGCB2-FW および pGVB2-RV プライマーを用いた DNA シークエンサー ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によりプラスミド内の挿入配列を確認後、

QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen)により精製した。

第8項 トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定

HEK293 を 0.5×10^5 cell/well で播種し、一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて 100 ng β -ガラクトシダーゼレポーターベクターを含む 100 ng レポーターベクター (pCLDND1-wt または pCLDND1-mt) と 100 ng ROR α 発現ベクター (pROR α) またはコントロールベクター (pSG5) の混合液をコトランスフェクションした。 β -ガラクトシダーゼレポーターベクターは、ルシフェラーゼのトランスフェクション効率を均一化するために用いた。12-16 時間後、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換し、さらに 24-32 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、ピッカジーン発光キット (Toyo Ink) を用いて、Luminescencer-PSN AB-2200 (Atto) により測定した。

第9項 ゲルシフト法 (Electrophoresis mobility shift assay : EMSA)

ROR α mRNA は *in vitro* transcription T7 kit (Takara Bio) により作成し、ウサギ網状赤血球ライセートシステム (Promega) を用いた *in vitro* 翻訳により ROR α タンパク質を調製した。EMSA は、三木らが報告した方法に準じて行った³⁶。標識プローブは、T4 Polynucleotide kinase (Takara Bio) および [γ -³²P]ATP (Perkin-Elmer) により調製した CLDND1 遺伝子の野生型 RORE オリゴヌクレオチド (CLDND1-ROREwt) を用いた。競合阻害剤として使用した非標識プローブは、CLDND1 遺伝子の変異型 RORE オリゴヌクレオチド (CLDND1-ROREmt) および I-kb 遺伝子の既知 RORE オリゴヌクレオチド (I-kb-RORE) を用いた。I-kb-RORE はポジティブコントロールとして用いた。Table 1 に使用したプローブの配列を示す。DNA-タンパク質結合は、20 mM HEPES (pH7.0)、50 mM KCl、1 mM DTT、5% グリセロール、20 μ g/mL dl/dC、0.025% NP-40 および ROR α 粗生成物を、0.02 pmol ³²P 放射性標識プローブ (CLDND1-ROREwt) と共に 30°C 20 分間反応させた。この際、コンペティターとして 0.1、0.2、0.4 または 0.8 pmol の非標識プローブ (I-kB-RORE または CLDND1-ROREmt) と共に反応させた。スーパーシフトアッセイは、プローブを添加する前に抗 ROR α (H-65) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を ROR α 粗生成物と反応させた。DNA-タンパク質結合反応液は、4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、イメー

ジングプレートに感光後、タイフーンシステム (GE Healthcare) により検出した。

第10項 siRNA ノックダウン

ROR α を標的とする siRNA (siROR α)、ROR α を非標的とするスクランブル変異型 siRNA (siROR α -mt) および緑色蛍光タンパク質特異的 siRNA (siGFP) は、*in vitro* transcription T7 kit (Takara Bio) により調製した。siGFP は、ネガティブコントロールとして用いた。Table 1 に siRNA の配列を示す。HBEC を 1.0×10^5 cell/well で播種し、一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて siRNA をトランスフェクションした。12-16 時間後、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換し、さらに 48 時間培養後、total RNA を抽出した。その後、逆転写および qRT-PCR を行った。siRNA トランスフェクションによる細胞生存率の影響は、細胞毒性検出キット PLUS (Roche) を用いた Microplate Reader model-550 (Bio-Rad Laboratories) の 490 nm で測定された乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性により評価した。

第11項 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差 (SE) で示した ($n = 3-5$)。2 群間の比較は、Student's *t*-test を行った。多群間の比較は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後に、ボンフェローニ法により検定を行った。P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとして解析した。

ラット組織およびヒト培養細胞間の mRNA 発現量の相関性は、Correl を行った。決定係数 (coefficient of determination : r^2) が 0.5 以上の場合を相関ありとして解析した。

第3節 結果

ヒト CLDND1 プロモーター領域中の推定 RORE の同定

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 データにより CLDND1 プロモーター領域中の DNase I 感受性部位および H3K27Ac(27 番目のリジンがアセチル化した H3 ヒストン)の ChIP-seq による免疫沈降部位(転写因子の結合しやすい部位)を調査した結果、-297 から-286 領域に RORE を特定した(Figure 4A、B)。ヒトとアカゲザルの RORE およびラットとマウスの RORE は、それぞれ高いおよび低い保存性を示した(Figure 4C)。

マウス肝癌細胞における CLDND1 転写調節において、AHR の関与が示唆されている³⁷。CLDND1 の転写調節に対する AHR の関与を明らかにするために、CLDND1 中に存在する AHR 結合部位の同定を *in silico* 解析により検討した。転写開始点データベースである DBTSS により³⁸、CLDND1 プロモーター領域(-1000 から+200)における AHR 結合部位 5' - T/G NGCGTG A/C G/C A - 3'(N は、A、T、G または C)³⁹を検索した結果、AHR 結合部位は示されなかった(データ未掲載)。

ラット組織における CLDND1 および ROR α mRNA の相関性

ラット組織における ROR α および CLDND1 mRNA 量の相関性を qRT-PCR により検討した。ROR α および CLDND1 間において強い相関性($r^2 = 0.801$)が確認された。それに対し、他の CLDN ファミリーである CLDN1 および ROR α 間において相関性($r^2 = 0.059$)は確認されなかった(Figure 5)。AHR についても評価した結果、ラット組織における AHR および CLDND1 間において相関性は確認されなかった(データ未掲載)。

ヒト培養細胞における CLDND1 および ROR α mRNA の相関性

ヒト培養細胞(HBEC、HEK293、HepG2 および HeLa)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。内因性 ROR α および

CLDND1 mRNA 量の最も多い細胞は、HEK293 であった (Figure 6A-D)。ヒト培養細胞においても ROR α および CLDND1 間において強い相関性 ($r^2 = 0.762$) が確認された (Figure 6E)。それに対し、CLDND1 および AHR 間において相関性 ($r^2 = 0.479$) は確認されなかった (Figure 6F)。ヒト培養細胞は、ラット組織と同様に ROR α および CLDN1 間において相関性は確認されなかった (データ未掲載)。

疑似低酸素刺激および ROR α 過剰発現による CLDND1 mRNA の影響

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^{36,40}。そこで、疑似低酸素 (コバルト処理) 条件下 HBEC における ROR α および CLDND1 mRNA レベルを評価した。コバルト処理 12 時間後の細胞における ROR α および CLDND1 mRNA レベルは、未処理の細胞と比べて、それぞれ 18.5 倍および 1.9 倍の有意な増加を示した (Figure 7A, B)。それに対し、AHR および CLDN1 mRNA レベルは、有意な変化を示さなかった (Figure 7C, D)。さらに、ROR α の安定発現株 (ROR α -St1 および ROR α -St2) における CLDND1 mRNA レベルは、コントロール HBEC と比べて、約 1.5 倍の有意な増加を示した (Figure 7E, F)。

CLDND1-RORE に対する ROR α の応答性

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 8A)。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。それに対し、変異型 RORE の 3 回繰り返し配列を含むレポーター (pROREx3-mt) の応答性は、有意な変化を示さなかった (Figure 8B)。

CLDND1-RORE に対する ROR α の結合性

CLDND1-RORE に対する ROR α の結合性を明らかにするために、EMSA 法によ

り検討した。EMSA に用いた RORE の配列は、Figure 9A に示す。CLDND1 の野生型 RORE を含む 20 bp のプローブ (CLDND1-ROREwt) を ^{32}P 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 1-kB 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 (Figure 9B)。

CLDND1 mRNA に対する ROR α ノックダウンの影響

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 10A)。siRNA トランスフェクションに対する細胞生存率の影響は、siRNA 処理または未処理細胞および各培地の LDH 活性を測定することにより評価した。siRNA 処理細胞の培地における LDH 活性の割合 (siGFP : 14.2%、siROR α : 13.9% および siROR α -mt : 13.1%) は、未処理細胞の培地 (12.8%) と同程度であった。よって、CLDND1 および ROR α mRNA レベルの減少は、細胞毒性による影響でないことが示された (Figure 10B)。

Table 1. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' - 3')
qRT-PCR (“Common” indicates the sequence is conserved between human and rat)	
rtCLDND1-FW(common)	GCATTCTCCATCTCCTTGCAAG
rtCLDND1-RV(common)	GCCTTCATTAAGGTGTACTC
rtRORA-FW(common)	TCCATGCAAGATCTGTGGAG
rtRORA-RV(common)	ACAGCATCTCGAGACATCCC
rtAHR-FW(common)	TAGCTACTCCACTTCAGCCAC
rtAHR-RV(common)	GCCACTTTCTCCAGTCTTAATC
rtCLDN1-FW(rat)	CTAAACGAACAGTTCATGGAG
rtCLDN1-FW(human)	CTAACTGAGCAGTTCATGGAG
rtCLDN1-RV(common)	CTGCAAGGAGATGGAGAATGC
rtACTB-FW(common)	GCACCACACCTTCTACAATG
rtACTB-RV(common)	CTCAAACATGATCTGGGTCATC
rtZO1-FW(human)	TCGCAGTATGCCAGCCATC
rtZO1-RV(human)	CCTGAGCAGTATCTTCTCGG
rtCDH1-FW(human)	GTCTGTCATGGAAGGTGCTC
rtCDH1-RV(human)	GGTGACCACACTGATGACTC
rtOCLN-FW(human)	AGTCCACCTCCTTACAGGCC
rtOCLN-RV(human)	GAGCATAGACAGGATCCGAATC
rt18S rRNA-FW(human)	CGATAACGAACGAGACTCTGG
rt18S rRNA-RV(human)	TAGGGTAGGCACACGCTGAGC
Luciferase reporter cloning (Mutated sequences are underlined)	
pCLDND1-ROREwt-FW	ATTCTACGCGTGGGAAATAAAATGGGTCAACG
pCLDND1-ROREmt-FW	ATTCTACGCGTGGGAAATAGGATCCGTCAACG
pCLDND1-RV	CCAGAAGTCGACGCCAATGGAGGCTGCCATGTAGATG
CLDND1-ROREwt-sense	GGAAATAAAATGGGTCAACGTT
CLDND1-ROREwt-antisense	AACGTTGACCCATTTTATTTCC
CLDND1-ROREmt-sense	GGAAATAGGATCCGTCAACGTT
CLDND1-ROREmt-antisense	AACGTTGACGGATCCTATTTCC
PGVB2-FW	CAAGTGCAGGTGCCAGAAC
PGVB2-RV	CACCTCGATATGTGCATCTG
EMSA (Mutated sequences are underlined)	
CLDND1-ROREwt-sense	GGAAATAAAATGGGTCAACGTT
CLDND1-ROREwt-antisense	AACGTTGACCCATTTTATTTCC
CLDND1-ROREmt-sense	GGAAATAGGATCCGTCAACGTT

CLDND1-ROREmt-antisense AACGTTGACGGATCCTATTTCC

Ikb-RORE-sense GATCCAATGTAGGTCACATG

Ikb-RORE-antisense CATGTGACCTACATTGGATC

siRNA experiments (Synthesized siRNA sequences are underlined)

siRORA1388-S-u GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCTAATGGCATTTAAAGCAATT

siRORA1388-S-d AATTGCTTTAAATGCCATTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC

siRORA1388-AS-u GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTGCTTTAAATGCCATTAGTT

siRORA1388-AS-d AACTAATGGCATTTAAAGCAACCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC

siGFP-S-u GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCTT

siGFP-S-d AAGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC

siGFP-AS-u GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGAACTTCAGGGTCAGCTTGTT

siGFP-AS-d AACAAGCTGACCCTGAAGTTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC

siRORAmt-S-u GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGATTACAACGAATCTAAGTTT

siRORAmt-S-d AAACTTAGATTCGTTGTAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC

siRORAmt-AS-u GATCACTAATACGACTCACTATAGGGACTTAGATTGTTGTAATCTT

siRORAmt-AS-d AAGATTACAACGAATCTAAGTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC

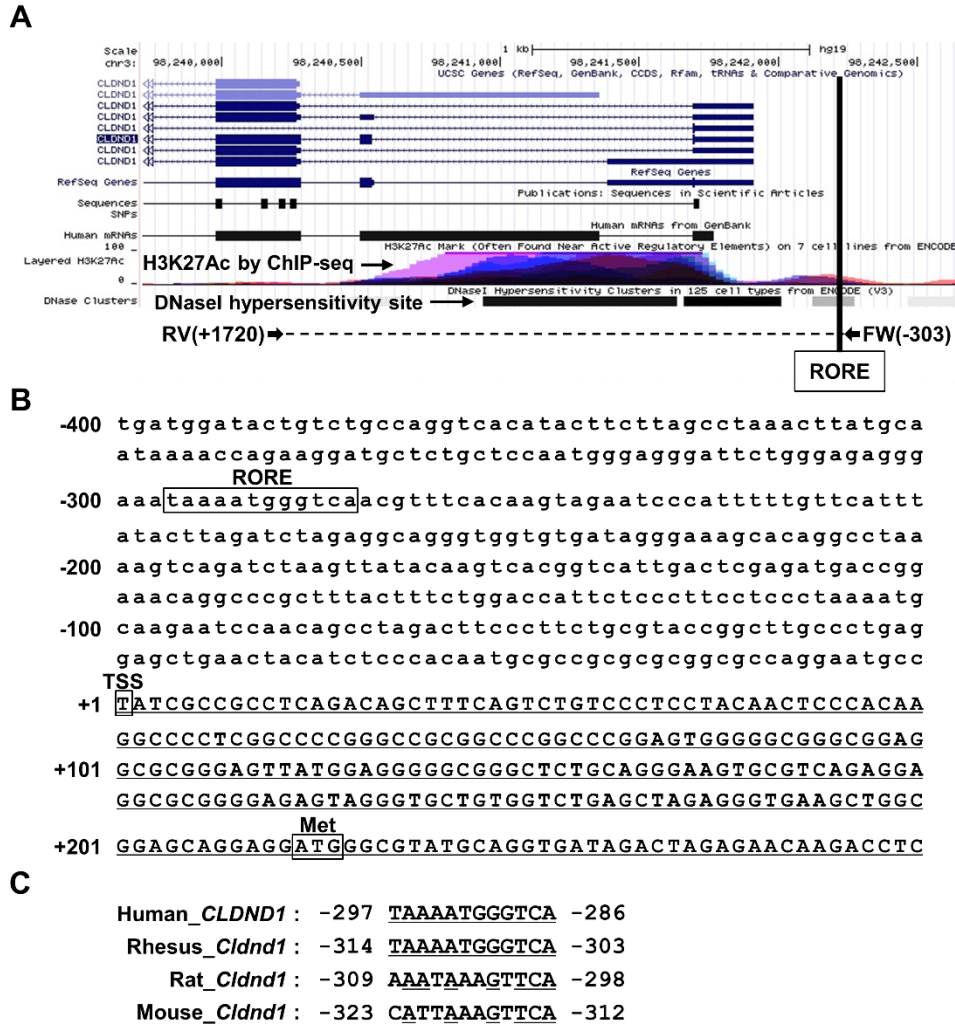


Figure 4. RORE in the promoter region of human CLDND1. (A) The ENCODE project data integrated in the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) were used to identify a distal, conserved putative RORE in the CLDND1 5' region containing the promoter, located within a DNase I hypersensitivity site and a ChIP-seq assay indicated H3K27Ac to be possibly involved in enhancement of transcription. Luciferase reporter constructs of the human CLDND1 promoter region amplified by PCR using RV (+1720) and FW (-303) primers. (B) Schematic representation of the human CLDND1 promoter. Sequence analysis revealed the presence of putative RORE located at positions -297 to -286 of the CLDND1 transcription start site (TSS,+1 to position). The exon region of CLDND1 transcripts is underlined. Met, translational start codon. (C) Alignment of putative ROREs in human, rhesus monkey (positions -314 to -303, GenBank accession no. NM_001265740), rat (positions -309 to -298, GenBank accession no. NM_001006955), and mouse (positions -323 to -312, GenBank accession no. NM_001252451) CLDND1 genes. The sequences of the putative response elements are shown, with the conserved regions underlined.

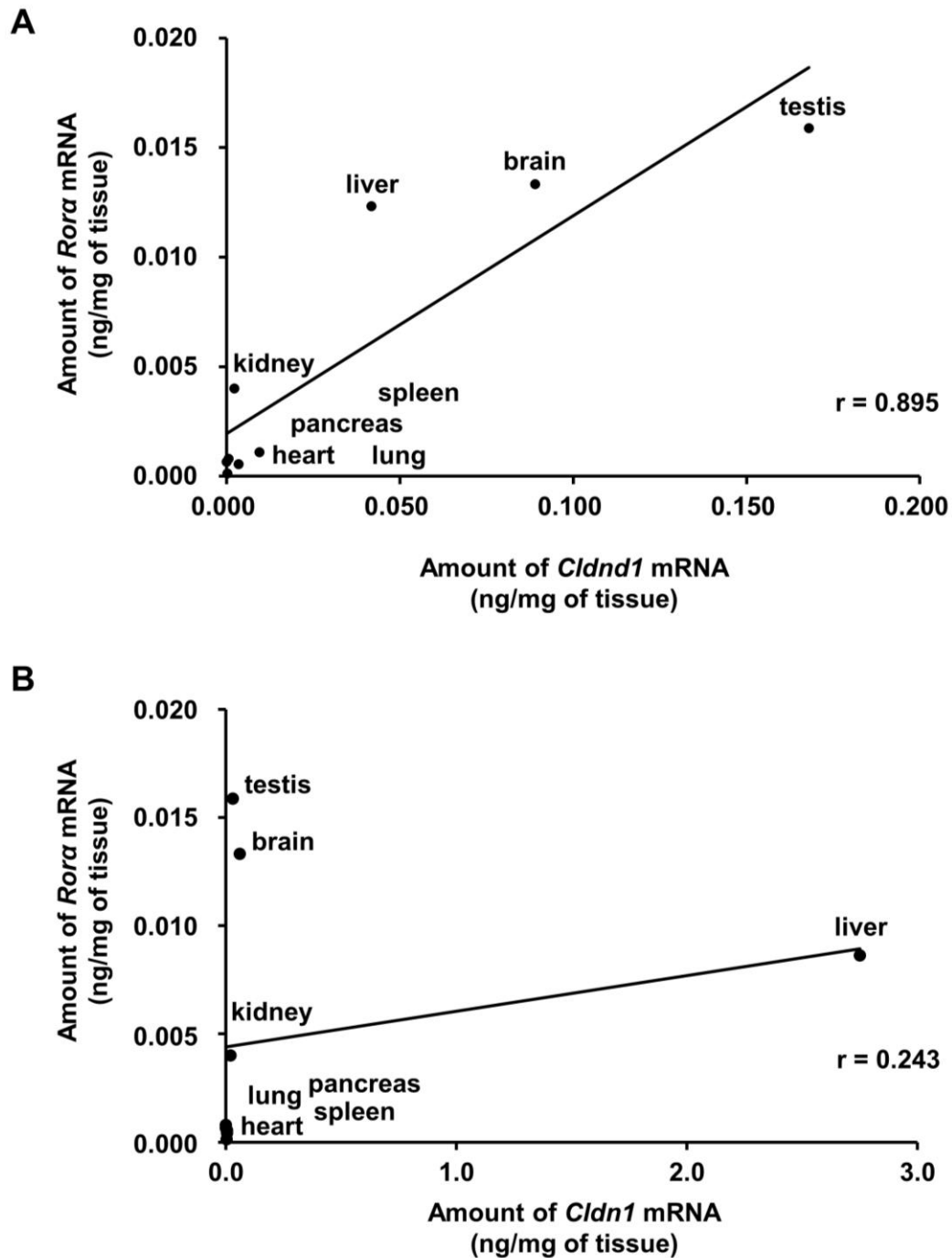


Figure 5. Association between CLDND1 and ROR α expression across various tissues in rat. The mRNA levels of ROR α , Cldnd1 and Cldn1 from various rat tissues were determined simultaneously to obtain a regression line. Correlation coefficients were obtained after simple curve-fit analysis of the relative expression of ROR α and Cldnd1 genes (**A**), and ROR α and Cldn1 genes (**B**).

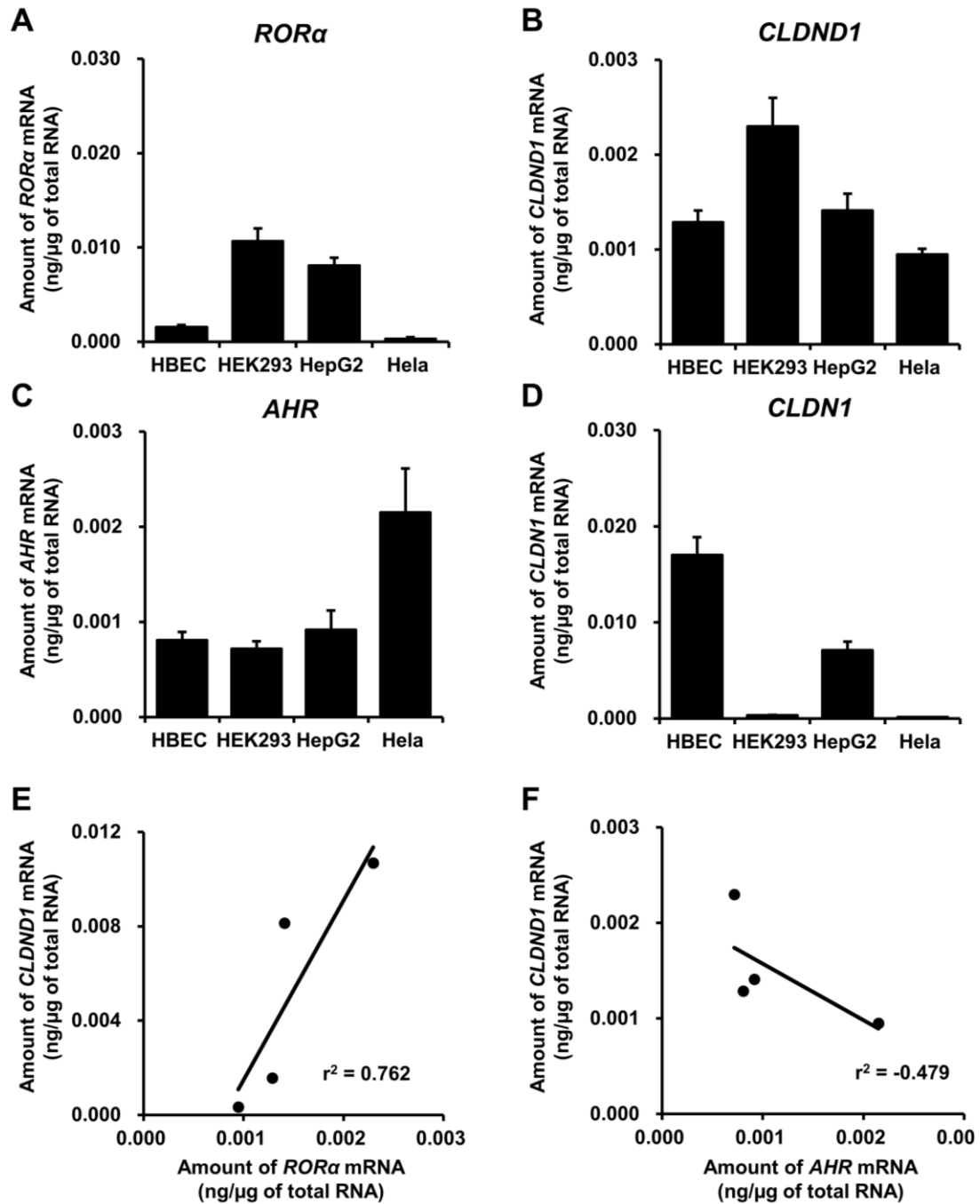


Figure 6. Comparison of endogenously expressed genes in human cells. Relative mRNA levels of *RORα* (A), *CLDND1* (B), *AHR* (C), and *CLDN1* (D) in 1 μg of total RNA of HBEC, HEK293, HepG2, Hela cells as quantified by qRT-PCR. All data are the means \pm S.E. of three independent experiments. Relationships between *CLDND1* and *RORα* expression (E) and between *CLDND1* and *AHR* expression (F) were determined simultaneously by drawing the regression line.

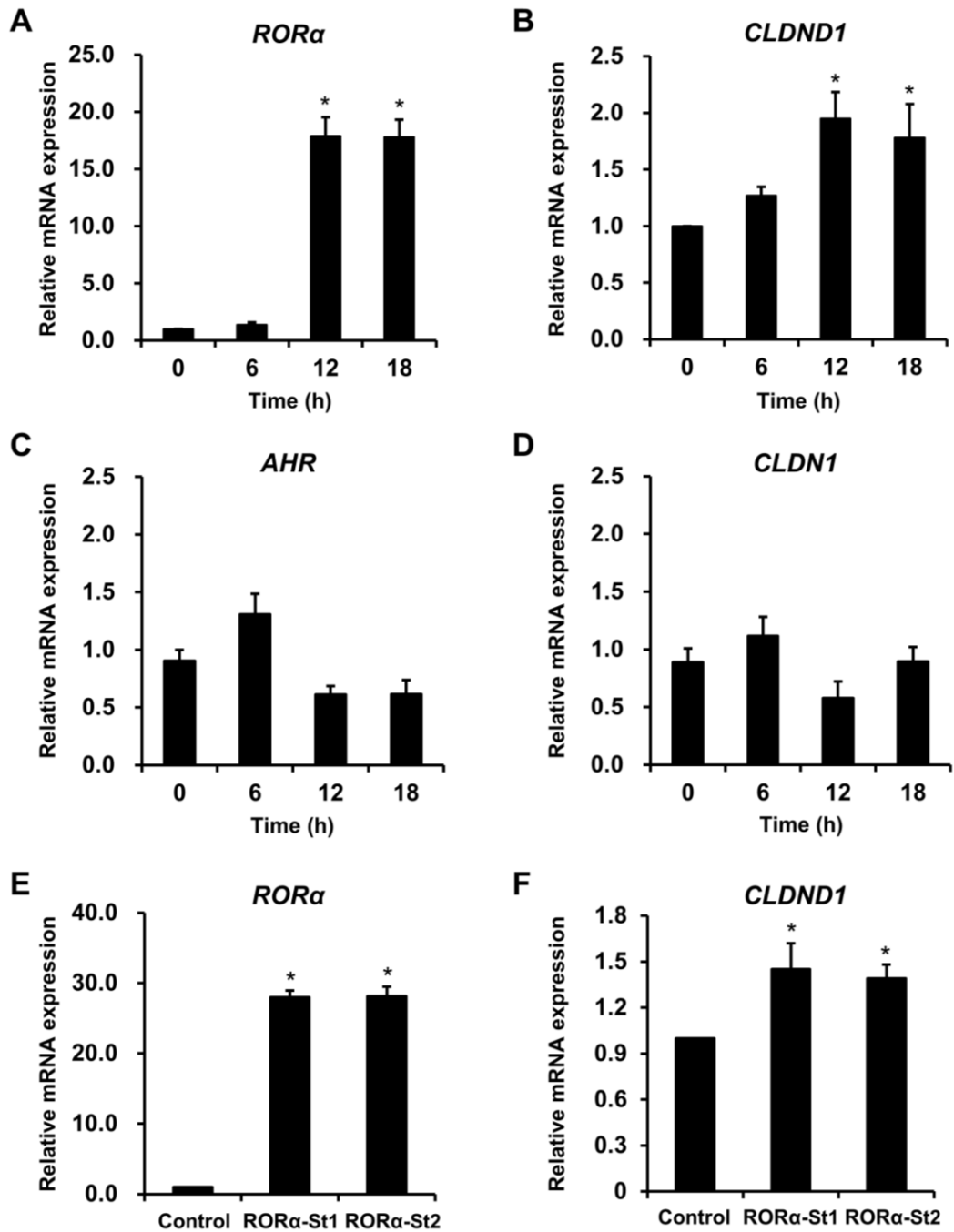


Figure 7. Hypoxic stimulation and overexpression of RORα leads to elevated CLDND1 gene expression. HBEC were treated with 300 μ M CoCl₂ to mimic hypoxia for the indicated times. mRNA expression of RORα (A), CLDND1 (B), AHR (C) and CLDN1 (D) was analyzed by qRT-PCR and normalized to β -actin. HBEC (Control) and HBEC stably expressing RORα (RORα-St1 and RORα-St2) were incubated for 48 hours. mRNA expression of RORα (E) and CLDND1 (F) was analyzed by qRT-PCR and normalized to β -actin. All data are the means \pm S.E. of four independent experiments. *P<0.05.

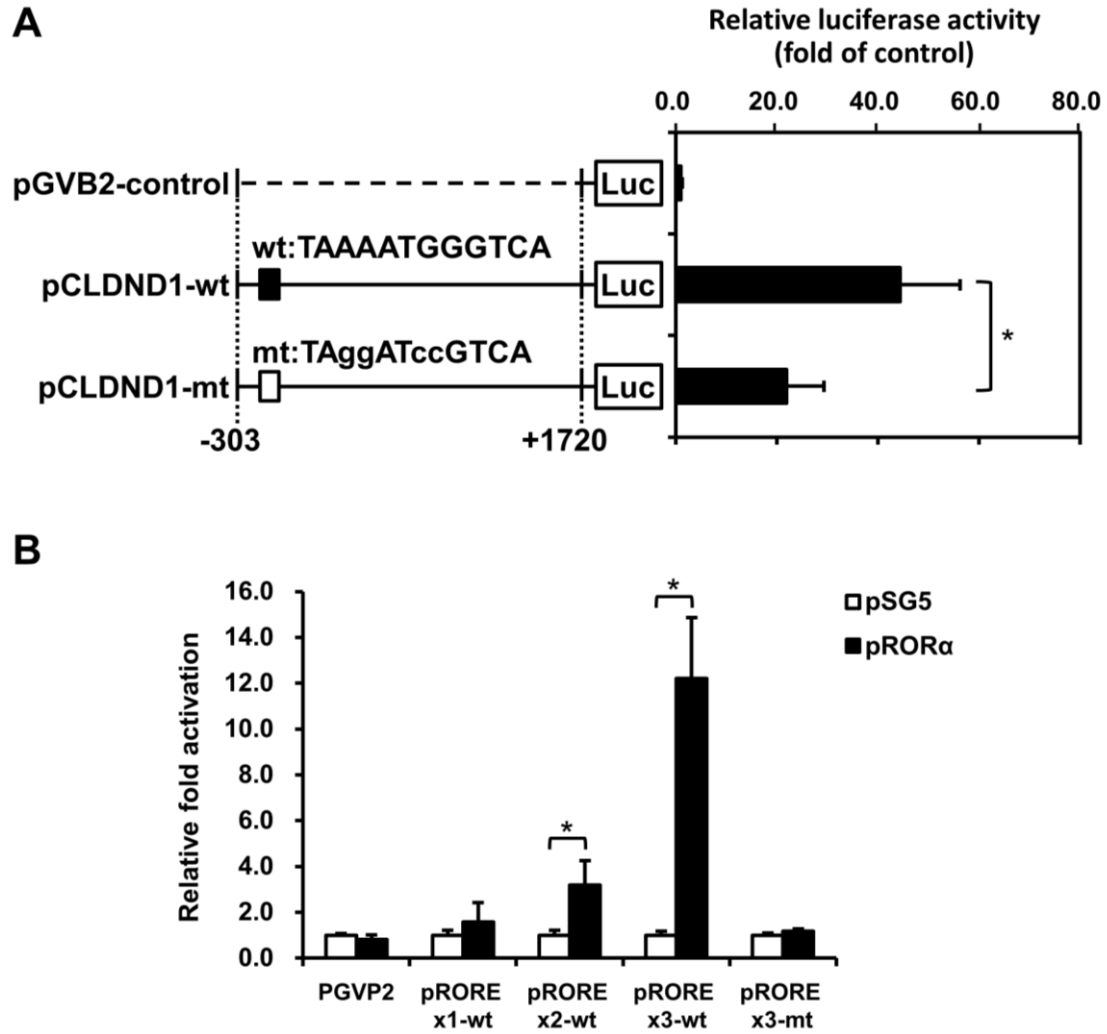


Figure 8. The ROR response element (RORE) of CLDND1 is directly activated by ROR α (A) Transactivation of the RORE of the CLDND1 promoter by the ROR α . The reporter plasmids pCLDND1-wt containing the wild-type RORE (TAAAATGGGTCA) and pCLDND1-mt containing the mutated-type RORE (TAggATccGTCA, mutated 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.

A

CLDND1-ROREwt : GGAAATAAAATGGGTCAACGTT

CLDND1-ROREmt : GGAAATAggATccGTCAACGTT

I- κ B-RORE : GATCCAATGTAGGTCACATG

RORE consensus : HWAWNTRGGTCA

B

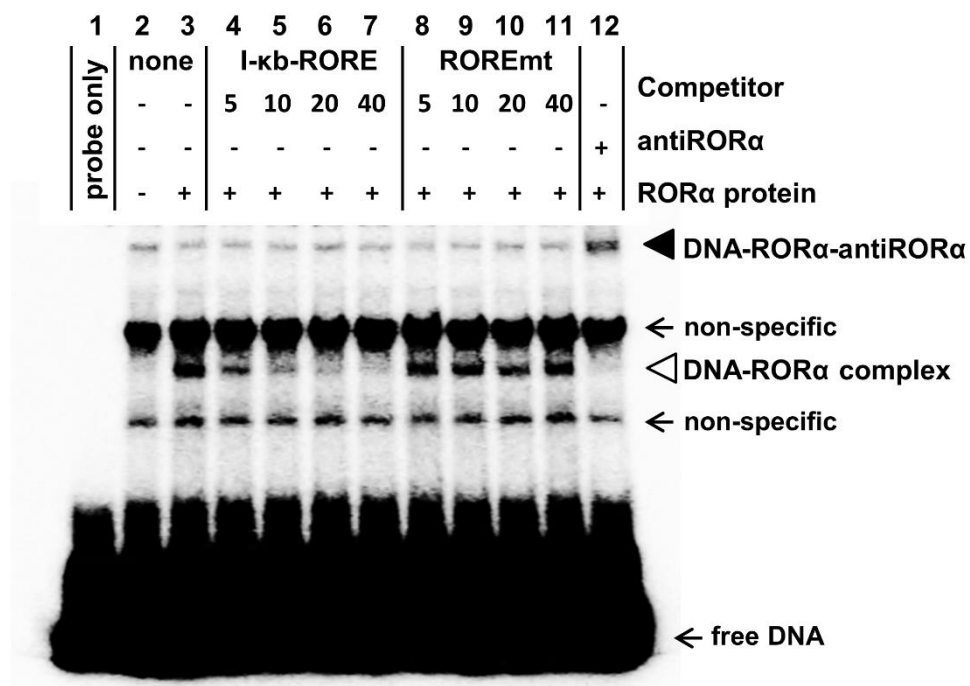


Figure 9. ROR α binds to a putative response element in CLDND1. (A) Sequence of the putative RORE (underlined) in human CLDND1. The probe mt is equivalent to this motif, except that the lowercase nucleotides have been mutated. The I- κ B probe contains the known ROR α response element in NF- κ B inhibitor α . The RORE consensus sequence is HWAWNTRGGTCA (H; A, C or T, W; A or T, N; A, C, G or T, R; A or G). (B) EMSA was used to test the ability of 32 P-radiolabeled wild-type and unlabeled I- κ B or mutated probes at 5-, 10-, 20- and 40-fold excess to inhibit the binding of ROR α to the putative response element (open arrowhead; DNA-ROR α complex). The positions of free probe (free DNA) and the nonspecific probe of ROR α for crude protein (non-specific) are shown. The ROR α antibody (antiROR α) was pre-incubated with the ROR α crude product before adding the oligonucleotide probe for the formation of the supershift band (filled arrowhead; DNA-ROR α -antiROR α). Each of the probes indicated was mixed with the ROR α crude product (lanes 3-12) or without ROR α protein (2nd lane), or with probe only (1st lane).

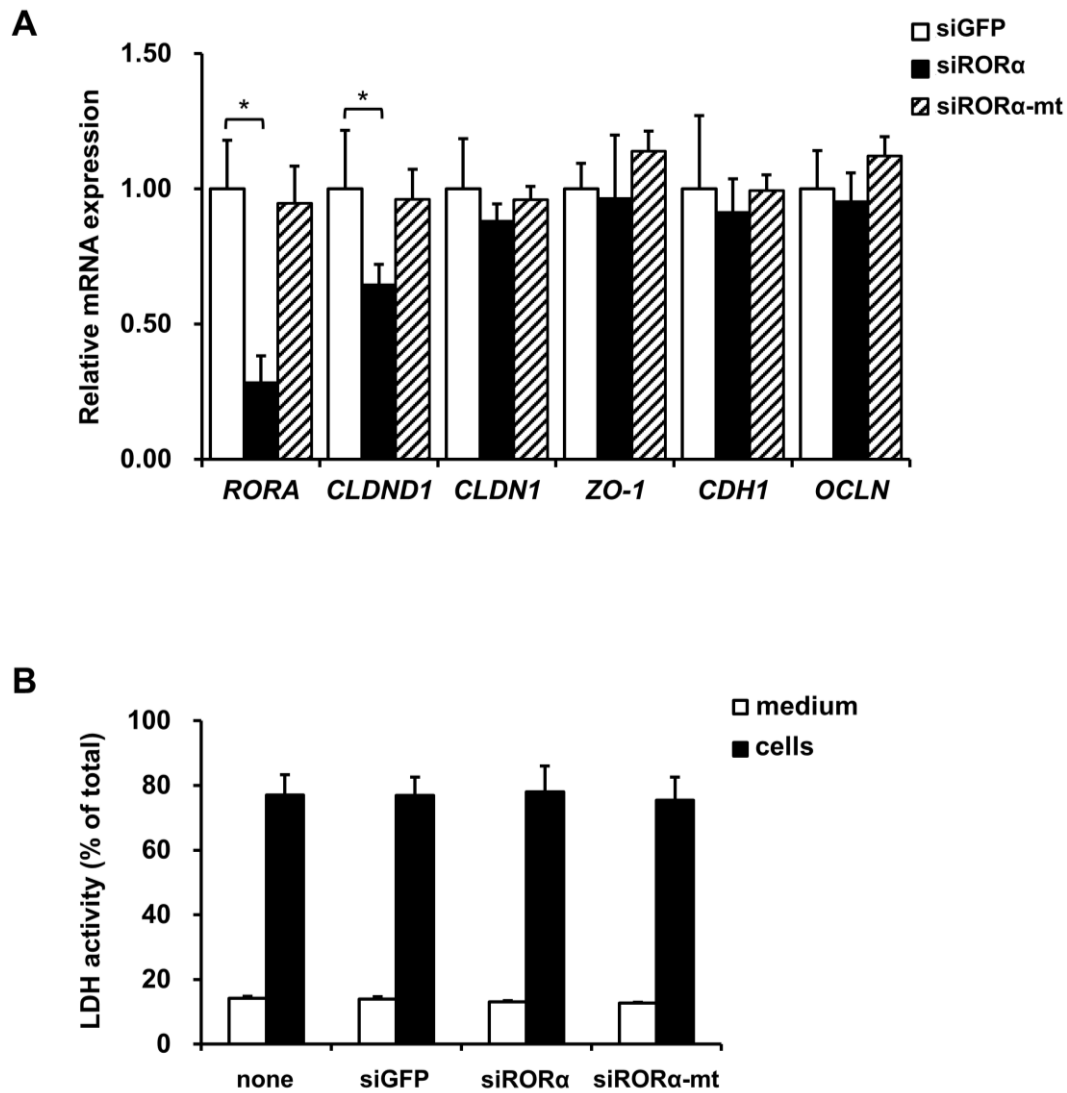


Figure 10. Effect of ROR α deficiency on CLDND1 expression. (A) Suppression of endogenous ROR α by siRNA significantly decreased CLDND1 mRNA in HBEC. HBEC were transfected with 50nM siRNA and analyzed by qRT-PCR to quantify the expression of ROR α , CLDND1, CLDN1, ZO-1, CDH1 and OCLN. Opened bars represent 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. (B) Effects of siRNA transfections on cell viability were estimated by measuring LDH activity in the culture media of siRNA-treated (siGFP, siROR α and siROR α -mt) and non-treated (none) cells. LDH activity in the medium (open bars) and cells (closed bars) were measured and expressed as a percentage of the total. Data are means \pm S.E. of four experiments.

第4節 考察

動脈硬化を含む多種多様な疾患に関わる ROR α は、CLDND1 の転写調節に関与することが考えられる。そこで本章においては、CLDND1 の転写調節機構に対する ROR α の関与について検討した。

UCSC Genome Browser に統合された ENCODE データによる DNase I 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 を特定した(Figure 4A、B)。ヒトの RORE 相同性をアカゲザル、ラット、マウス間で比較した結果、アカゲザルの RORE は高度に保存されていた。しかし、ラットとマウスの RORE は低い保存性であった。よって、CLDND1 の転写調節に対する ROR α の関与は、ヒトとアカゲザルに共通して存在し強く影響することが示唆された(Figure 4C)。

ラット組織およびヒト細胞株において CLDND1 と ROR α mRNA 量の間で正の相関性が示された(Figure 5、6)。また、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(Figure 7)。遺伝子の転写調節は複数の転写因子による相互作用が示されている。よって、CLDND1 の転写調節に対して ROR α 以外の転写因子による関与が考えられる。AHR は、マウス肝癌細胞において CLDND1 の転写調節に影響していることが報告されている³⁷。しかし、ヒト CLDND1 のプロモーター領域中において AHR 結合部位を検索した結果、AHR の直接的な関与は示されなかった。ルシフェラーゼレポーター解析の結果より、ROR α は、CLDND1-RORE に対する応答性が示された(Figure 8)。加えて、EMSA 法の結果より、ROR α が CLDND1-RORE に直接結合することが示された(Figure 9)。さらに、siRNA による ROR α mRNA レベルの抑制は CLDND1 mRNA レベルを有意に減少させることが示された(Figure 10)。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。

第5節 小括

本章における検討により以下の知見が得られた。

1. CLDND1 プロモーター領域の-297 から-286 中に ROR α 応答エレメント (RORE) が示された。
2. ラット組織およびヒト細胞株において ROR α と CLDND1 mRNA 量の間で正の相関性が示された。
3. ROR α 過剰発現および siRNA を介した ROR α ノックダウンにおいて、それぞれ CLDND1 mRNA レベルの増加および低下を生じることが示された。
4. ROR α は CLDND1 プロモーター領域中の RORE に直接結合することにより、転写調節に関与していることが示された。

以上の結果から、ROR α はヒト CLDND1 プロモーター領域の RORE (-297 から-286) に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していることが明らかとなった (Figure 11)。

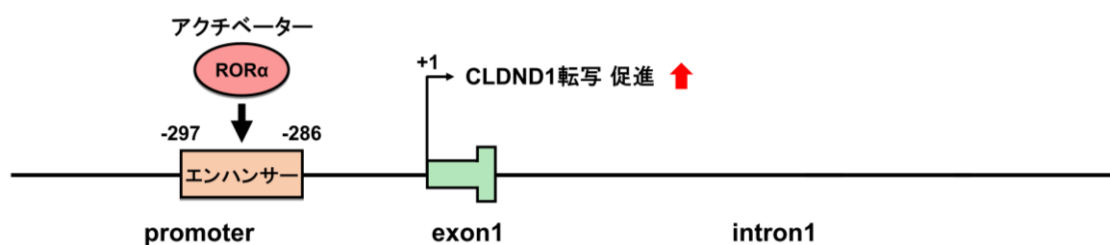


Figure 11. 細胞接着分子 CLDND1 に対する ROR α の転写調節機構

第2章 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

第1節 序論

第1章に記述したように、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^{41,42}。さらに、7-オキシステロールおよび24S-ヒドロキシコレステロールなどは、ROR α のインバーサゴニスト(抑制作用)として機能し ROR α 標的遺伝子を調節することが報告されている^{43,44}。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^{45,46}。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^{47,48}。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²³。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、本章においては 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。初めに、培養細胞を用いたロバスタチン処理細胞における CLDND1-RORE に対する ROR α 結合性および応答性を評価した。さらに、ロバスタチン処理細胞中の ROR α と CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルを評価した。

第2節 実験方法

第1項 細胞培養

HepG2 の培養は、第 1 章の第 2 節、第 1 項と同様の操作で行った。ロバスタチン処理に用いた HepG2 は $1.0\text{-}5.0\times 10^5\text{cell/well}$ で播種し、一晩培養後、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換した。10-20 μM ロバスタチン(Merck)またはコントロールとして Dimethyl sulfoxide(DMSO; Nacali tesque)を添加し(ロバスタチンと同量)、さらに 24-72 時間培養した。ロバスタチンを添加した細胞は、抗生物質のみを含む DMEM を用いた。

第2項 クロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation assay : ChIP)

HepG2 を 90 mm シャーレに播種し、90%コンフルエンスになるまで一晩培養後、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換した。10 μM ロバスタチンまたはコントロールとして DMSO を添加し(ロバスタチンと同量)、さらに 72 時間培養した。ロバスタチンを添加した細胞は、抗生物質のみを含む DMEM を用いた。クロマチンを 1%ホルムアルデヒド中、室温で 10 分間架橋させ、2.5 M グリシン 0.5 mL を加え 4°C で 10 分間静置し、反応を停止させた。細胞は、PBS(-) で 2 回洗浄し、低速遠心分離により収集後、OneDay ChIP kit(Diagenode)を用いて免疫沈降反応を行った。抗体は、1 μg 抗 ROR α (C-16)抗体(Santa Cruz Biotechnology)またはネガティブコントロールとして非免疫 IgG 抗体を用い、ローテーターにより 4°C で一晩混合した。抗体-タンパク質-DNA 複合体は、プロテイン A ビーズ(Diagenode)と 4°C で 1 時間混合し、10 分間の遠心分離($1000\times g$)により免疫沈降させた。抽出した DNA は、Table 2 に示す CLDND1 プロモーター領域の RORE に特異的なプライマーにより PCR で増幅した。PCR 産物を 3%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色後、CS アナライザー(Atto)により視覚化した。

第3項 トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定

HepG2 を $0.5\times 10^5\text{cell/well}$ で播種し、一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて 100 ng β -ガラクトシダーゼレポーターベクターを含む 100 ng レポーターベクター

(pROREx3-wt)、100 ng ROR α 発現ベクター(pROR α)またはコントロールベクター(pSG5)の混合液をトランスフェクションした。12-16 時間後、抗生物質のみを含む新しい DMEM に交換し、20 μ M ロバスタチンのみ、20 μ M ロバスタチンを含む 50 nM コレステロールを添加後、さらに 24-32 時間培養した。また、コントロール細胞は、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換後、DMSO を添加し(ロバスタチンと同量)、前述と同様の時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、第 1 章の第 2 節、第 7 項と同様の操作で測定した。

第4項 RNA の抽出

第 1 項で培養した細胞は、第 1 章の第 2 節、第 4 項と同様の操作で RNA を抽出した。

第5項 qRT-PCR

逆転写反応および qRT-PCR は、Table 2 に示すプライマーを用いて第 1 章の第 2 節、第 5 項と同様の操作で行った。

第6項 ウェスタンブロット法

細胞は、ホモジネートバッファー(50 mM Tris-HCl[pH 7.0]、200 mM スクロース、1 mM EDTA、1 mg/mL ロイペプチン、1 mg/mL ペプスタチン、0.5 mM フェニルメチルスルホニルフルオリドおよび 1% SDS)で破碎し、タンパク質を抽出した。サンプル中のタンパク質を 12% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量で分離後、Immobilon-P メンブレン(Merck Millipore)に転写した。メンブレンは、1 次抗体である抗 CLDND1 抗体²³、抗 ROR α (H-65)抗体または抗 β -アクチン抗体(Proteintech Group)により、それぞれ 4°Cで一晩インキュベートした。次に、2 次抗体である西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ウサギまたはマウス IgG 抗体(GE Healthcare)により、それぞれ 90 分間インキュベートした後、ECL prime ウェスタンブロットティング検出試薬(GE Healthcare)を用いて視覚化した。バンド強度は CS アナライザー(Atto)で分析した。

第7項 統計学的解析

データは平均値±標準誤差(SE)で示した($n = 3-5$)。2 群間の比較は、Student's t -test を行った。多群間の比較は、one-way ANOVA 後に Tukey's test を行い、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとして解析した。

第3節 結果

CLDND1-RORE と ROR α 結合性に対するロバスタチンの効果

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および処理細胞における抗 ROR α 抗体を用いた免疫沈降量は、非免疫 IgG 抗体と比べて、それぞれ増加および低下していることが示された (Figure 12)。

ROR α 応答性に対するコレステロール量の影響

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。ROR α 発現ベクター (pROR α) を用いた ROR α 共発現においても同様にロバスタチン処理により低下した応答性は、コレステロールの添加により回復を示した (Figure 13)。しかし、ロバスタチン処理細胞による ROR α 共発現における応答性は、コントロールと比べて、有意に低下していることが示された (データ未掲載 : * $p < 0.05$.)。

CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルに対するロバスタチンの影響

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メバロン酸ニリン酸脱炭酸酵素 (MPD)、ROR α および CLDND1 mRNA レベルを qRT-PCR により評価した。ロバスタチンの作用を確認するために、スタチンにより発現が誘導される MPD (コレステロール合成酵素の 1 つ) について⁴⁹、mRNA レベルを評価した。その結果、ロバスタチン処理細

胞における MPD mRNA レベルは、未処理細胞と比べて、約 6 倍の有意な増加を示した。これにより、ロバスタチンの効果が確認された。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 14)。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 15)。

Table 2. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' - 3')
ChIP	
hCLDND1-RORE_FW	GGATACTGTCTGCCAGGTCAC
hCLDND1-RORE_RV	CGGTCATCTCGAGTCAATGAC
qRT-PCR	
rtCLDND1-FW	TAACTGAGCAGTTCATGGAG
rtCLDND1-RV	TAAGCTTCGGCAAATGCAAG
rtRORA-FW	TCCATGCAAGATCTGTGGAG
rtRORA -RV	ACAGCATCTCGAGACATCCC
rtMPD-FW	CTCTTACCTCAATGCCATCTC
rtMPD-RV	CACAAACTCAGCCACAGTGTC
rt18SrRNA-FW	CGATAACGAACGAGACTCTGG
rt18SrRNA-RV	TAGGGTAGGCACACGCTGAGC

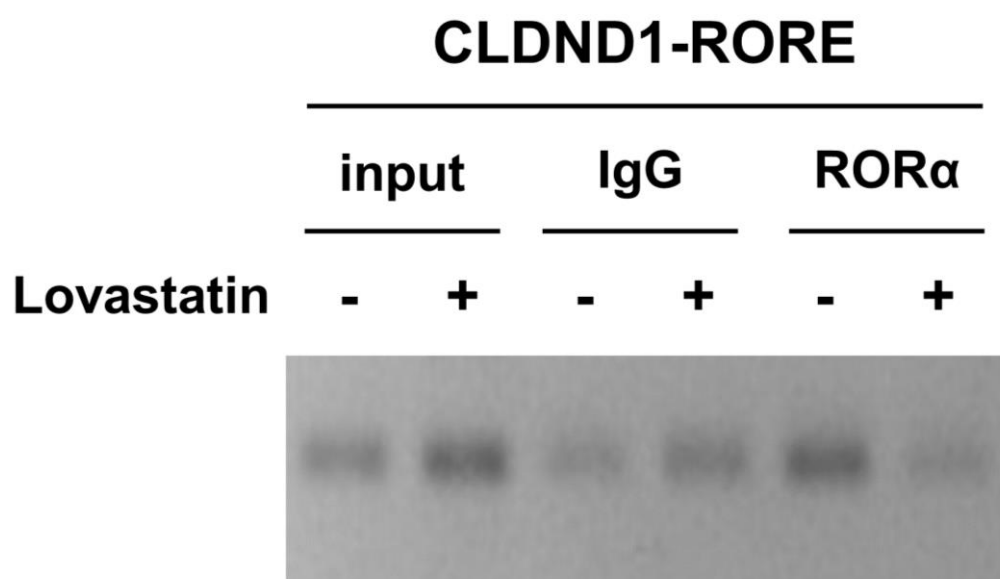


Figure 12. Binding of ROR α and ROR α response element in CLDND1 promoter region suppressed by lovastatin. Binding between ROR α and the ROR α response element in the CLDND1 promoter by lovastatin using ChIP-PCR. HepG2 cells were treated with lovastatin or vehicle for 72 hours. Cross-linked chromatin was isolated. Non-immune IgG or anti-ROR α antibodies were used for immunoprecipitation.

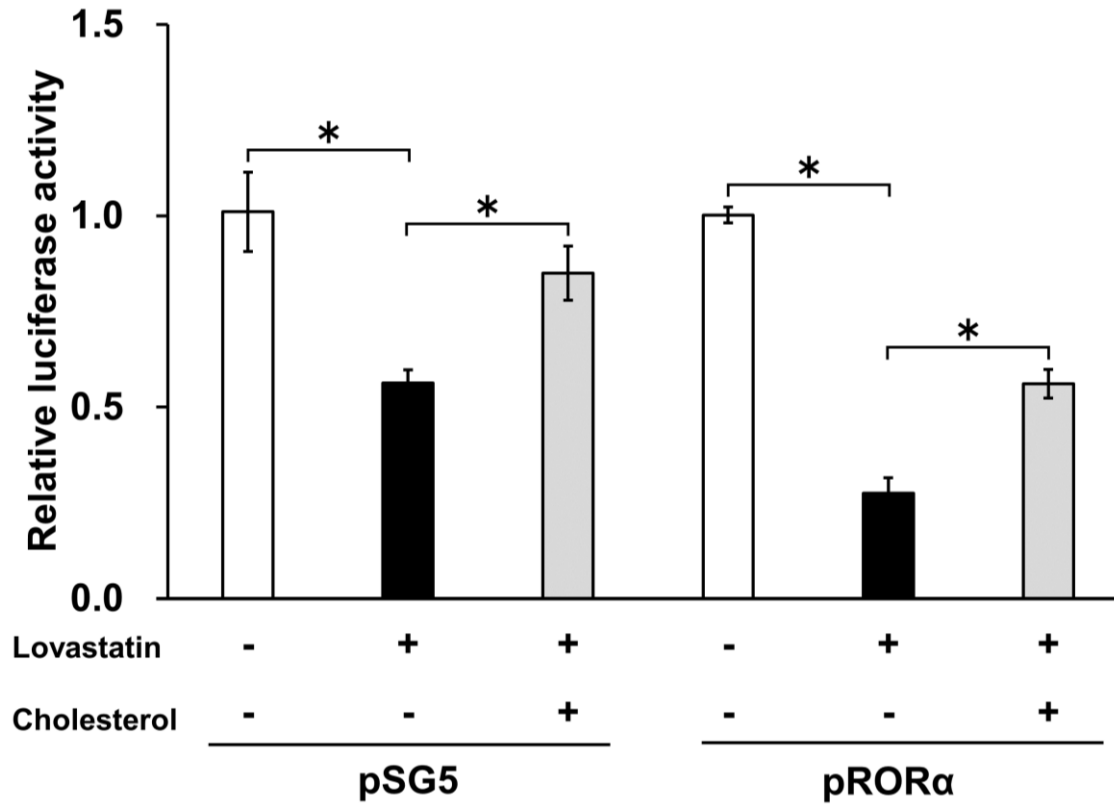


Figure 13. RORα responsiveness to RORα responsive elements by cholesterol level. HepG2 cells were co-transfected with an empty vector (pSG5) or RORα expression plasmids (pRORα) and the luciferase reporter plasmid containing three copies of the RORE (pROREx3). The results show the relative luciferase activity of each condition, with and without lovastatin or cholesterol treatment. Results also compare luciferase activity after lovastatin treatment with and without cholesterol. Data are mean ± S.E. (n = 4). *P<0.05.

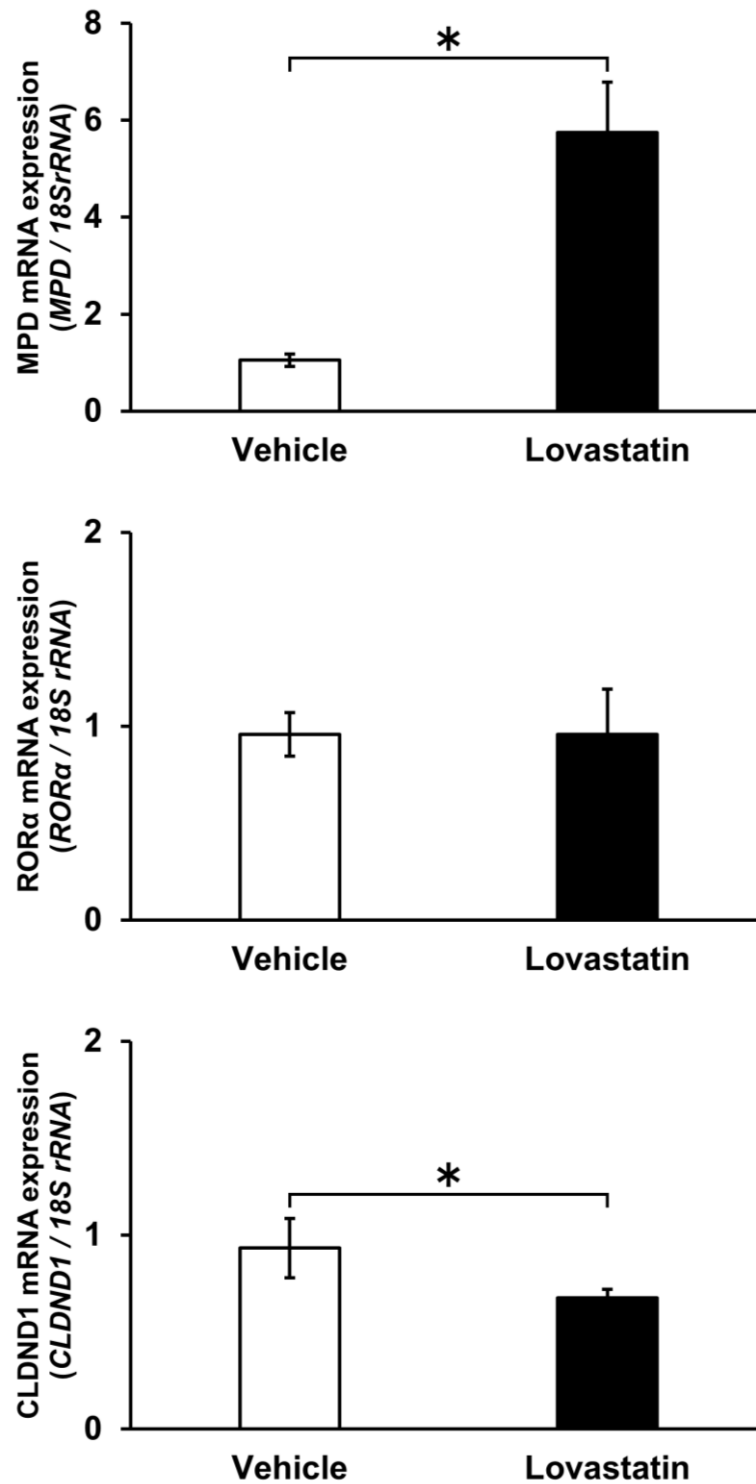


Figure 14. Expression level of CLDND1 mRNA with lovastatin addition in HepG2. HepG2 cells were treated with lovastatin or vehicle for 24 hours. mRNA expression of MPD, RORα and CLDND1 were analyzed by qRT-PCR and normalized to 18S rRNA. Data are mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.05.

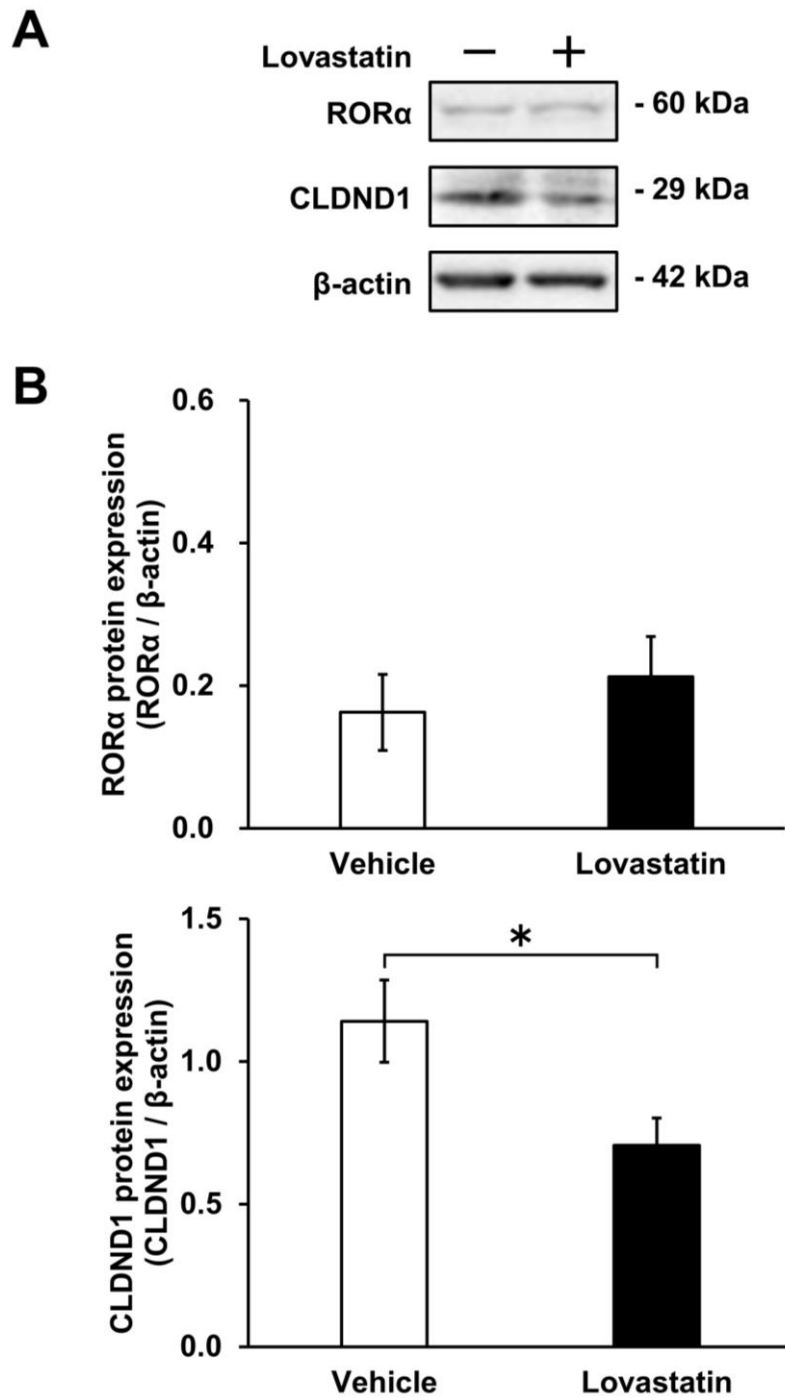


Figure 15. Expression level of CLDND1 protein with lovastatin addition in HepG2. (A) Representative blots of ROR α and CLDND1 protein expression in the HepG2 cells. (B) HepG2 cells were treated with lovastatin or vehicle for 72 hours. Protein expression of ROR α and CLDND1 was analyzed by immunoblotting and normalized to β -actin. Protein expression was quantified using the Intelligent Quantifier. Data are mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.05.

第4節 考察

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、ROR α はリガンドであるコレステロール類に依存して転写を調節していることが報告されている⁴²⁻⁴⁴。本章では ROR α を介した CLDND1 の発現調節に対するコレステロール類の影響についてロバスタチンを用いて検討した。

ChIP 法およびルシフェラーゼレポーター解析により、ロバスタチン処理細胞中の RORE に対する ROR α の結合性および応答性は、未処理細胞と比べて、共に抑制された (Figure 12、13)。これらの結果から、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。ロバスタチン処理細胞における ROR α mRNA およびタンパク質レベルは、ロバスタチン未処理細胞と比べて、有意な変化を示さなかった。しかし、CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルは、有意な低下を示した (Figure 14、15)。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。

疫学調査の結果、脳卒中関連の危険因子としてコレステロール値の変化が示されている^{50,51}。さらに、総コレステロール値の低下は、脳内出血の増加と関連している⁵²。前述の報告と本研究の結果から、スタチンの過剰摂取によりコレステロール類を低下させた条件において、細胞接着分子の転写抑制を生じさせ、TJs の崩壊により細胞膜の脆弱化を通じて、脳出血を引き起こす可能性が示された。脳卒中の研究に広く用いられる SHRSP は、重度の高血圧を示し、100%脳卒中を発症するモデル動物である⁵³。SHRSP が引き起こす脳出血の大部分は大腦であり(一部は脳幹部)、小脳で

は非常に稀である⁵⁴。SHRSPの血清コレステロールならびに脳内コレステロールの含量は、対照ラット(ウイスター京都ラット : WKY)と比べて、多くの部位(大脳、間脳、橋および延髄)において有意な低下を示している⁵⁵。しかし、SHRSPの小脳におけるコレステロール含有量と CLDND1 の発現量は、有意に増加していた^{24,56}。よって SHRSP の小脳は、コレステロールにより ROR α を介した CLDND1 発現を促進し、強固な TJs を形成することにより小脳出血を抑制している可能性が示された。

第5節 小括

本章における検討により以下の知見が得られた。

1. CLDND1 プロモーター領域の-297 から-286 中に保存された ROR α 応答エレメント(RORE)に対する ROR α の結合性および応答性は、ロバスタチンにより低下することが示された。
2. ロバスタチン処理細胞において低下した ROR α の応答性は、コレステロールを添加することにより一部回復することが示された。
3. ロバスタチン処理細胞における ROR α および CLDND1 発現レベルは、未処理細胞と比べて、それぞれ同程度および低下を生じることが示された。

以上の結果から、ロバスタチンによるコレステロール類の低下は、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 発現調節に対して抑制的に作用することが明らかとなった(Figure 16)。

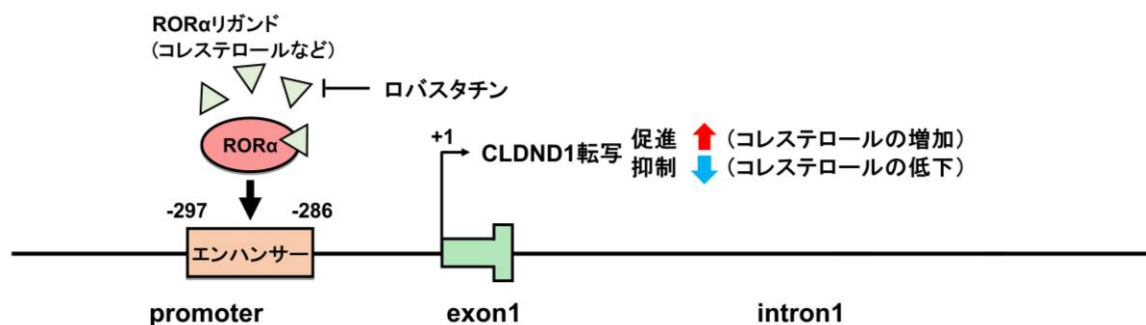


Figure 16. ロバスタチンによる ROR α を介した CLDND1 の発現調節機構

第3章 細胞接着分子 CLDND1 の発現調節に関与する転写因子 MZF1 の影響

第1節 序論

第1章に記述したように、ROR α はヒト CLDND1 プロモーター領域の RORE (-297 から-286) に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していることが示された。さらに、第2章に記述したように、ロバスタチンによるコレステロール類の低下は、CLDND1-RORE に対する ROR α 結合性および CLDND1 の発現調節に関与することが示された。しかし、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⁵⁷。そこで、本章においては 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。同定した転写調節配列に結合する新規転写因子を探索した結果、Myeloid Zinc Finger 1 (MZF1) が同定された。次に、転写調節配列に対する MZF1 の応答性および結合性を評価した。加えて、MZF1 過剰発現およびノックダウンにおける CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルの変化を評価した。さらに、MZF1 ノックダウンにおける細胞間の物質透過性についても評価した。

第2節 実験方法

第1項 細胞培養

HBEC の培養は、第 1 章の第 2 節、第 1 項と同様の操作で行った。

第2項 レポーターベクターの構築

ヒト CLDND1 プロモーター領域の-308 から+891 を基準とし、段階的な欠失および変異型の DNA 断片は、Table 3 に示すプライマーを用いて PCR により増幅した。その PCR 産物を Mlu I /Sal I で処理し、pGVB2 ベクターの Mlu I /Xho I 部位に挿入した。プラスミドのシーケンス解析および精製は、第 1 章の第 2 節、第 6 項と同様の操作で行った。

第3項 トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定

HBEC を 0.5×10^5 cell/well で播種し、一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて 200 ng レポーターベクターおよび 200 ng β -ガラクトシダーゼレポーターベクターの混合液をトランスフェクションした。過剰発現は、100 ng MZF1 発現ベクター (pMZF1) またはコントロールベクター (pSG5) をコトランスフェクションした。siRNA ノックダウンは、50 nM siMZF1 または siGFP をコトランスフェクションした。12-16 時間後に、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換後、さらに 24-32 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、第 1 章の第 2 節、第 6 項と同様の操作で行った。

第4項 ChIP 法

HBEC を 90 mm シャーレに播種し、90%コンフルエンスになるまで一晩培養後、3 μ g ルシフェラーゼレポーターベクター (CLDND1 の-308 から+891 領域を含む) および pMZF1 をコトランスフェクションした。14 時間後に血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換後、さらに 72 時間培養した。免疫沈降反応は、抗 MZF1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または非免疫 IgG 抗体を用いて、第 2 章の第 2 節、第 2 項と同様の操作で行った。MZF1 結合配列への相対的結合強度は Table 3 に示すプライマーを用いて、Roche Light Cycler (Roche) を使用し、SYBRGreen Real-time PCR

マスターミックス(Toyobo)を用いた定量的 PCR により算出した。

第5項 qRT-PCR

逆転写および qRT-PCR は Table 3 に示すプライマーを用いて、第 1 章の第 2 節、第 5 項と同様の操作で行った。

第6項 ウェスタンブロット法

タンパク質の抽出、SDS-PAGE、メンブレンへの転写、抗原抗体反応およびバンド強度の解析は、第 2 章の第 2 節、第 6 項と同様の操作で行った。1 次抗体として抗 MZF1 抗体、抗 CLDN1 抗体または抗 β -アクチン抗体を用いた。

第7項 過剰発現

HBEC を $1.0\text{--}2.0\times 10^5\text{cell/well}$ で播種し、一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて 300 ng MZF1 発現ベクター(pMZF1 または pCI-MZF1)またはコントロールベクター(pSG5 または pCI-neo)をトランスフェクションした。12-16 時間後に、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換後、さらに 48-72 時間培養した。

第8項 siRNA ノックダウン

MZF1 を標的とする siRNA(siMZF1)の調製は、第 1 章の第 2 節、第 9 項と同様の操作で行った。siRNA の配列は Table 3 に示す。HBEC を $1.0\times 10^5\text{cell/well}$ で播種し、一晩培養後、Lipofectamine 2000 を用いて siRNA をトランスフェクションした。12-16 時間後に、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換し、さらに 48 時間培養後、total RNA を抽出した。Total RNA の抽出は、第 1 章の第 2 節、第 4 項と同様の操作で行った。

第9項 透過性試験

24 ウェルプレートにセットした透過膜インサート(Milicell ハンギング細胞培養インサート[Merck])上の HBEC ($2.0\times 10^5\text{cell/well}$)に Lipofectamine 2000 を用いて siRNA をリバーストランスフェクションした。一晩培養後、さらに siRNA をトランスフェ

クシオンし、24 時間培養した。透過膜の上部(インサート内側)および下部(ウェル側)をそれぞれ 0.1 mL および 0.6 mL の血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換後、さらに 48 時間培養した。1 mg/mL FITC 標識デキストラン(平均分子量 : 4,000; Sigma-Aldrich)を透過膜の上部に添加し、30 分、60 分、90 分および 120 分インキュベート後、透過膜の下部からサンプルをそれぞれ採取し、透過した FITC の蛍光を自動マルチウェルプレートリーダー(Molecular Devices)で測定した(励起 : 485 nm、発光 : 535 nm)。

第10項 統計学的解析

データは平均値±標準誤差(SE)で示した(n = 3-6)。2 群間の比較は、Student's *t*-test を行った。多群間の比較は、one-way ANOVA 後に Tukey's test を行い、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとして解析した。

第3節 結果

CLDND1 プロモーター領域(-308 から+891)の欠失レポーターに対する応答性

CLDND1 の新規転写調節機構を明らかにするために、転写応答配列を *in silico* 解析および CLDND1 プロモーター領域の段階的欠失レポー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検討した。UCSC Genome Browser に統合された ENCODE データを使用し、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、第 1 イントロンを含む -308 から+891 の領域を CLDND1 プロモーター領域であると推定した(Figure 17A)。CLDND1 推定プロモーター領域の応答性は、-308 から+891 の領域を基準とした段階的欠失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評価した。プロモーター領域+686 までの欠失は、欠失前の+891 と比べて、2.0 倍の有意な応答性の増加を示した。次に、+491 までの欠失は、欠失前の+686 と比べて、2.0 倍の有意な応答性の増加を示した。しかし、+192 までの欠失は欠失前の+491 と比べて、有意な変化を示さなかった(Figure 17B)。さらに、応答性を示す領域を絞り込むために、欠失の前後で最も応答性が示された-308 から+491 の領域を基準とした段階的欠失レポーターベクターを用いて評価した。+609 までの欠失は、欠失前の+686 と比べて、1.5 倍の有意な応答性の増加を示した。それに対し、+568 までの欠失は、欠失前の+609 と比べて、有意な変化を示さなかった。さらに、+529 までの欠失は、欠失前の+568 と比べて、3.2 倍の有意な応答性の増加を示した。+491 までの欠失は、欠失前の+529 と比べて、0.6 倍の有意な応答性の低下を示した(Figure 17C)。以上の結果より、CLDND1 第 1 イントロン中の+529 から+568 領域に転写抑制配列(サイレンサー)の存在が示された。

MZF1 結合配列に対する MZF1 応答性および結合性

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した。その結果、サイレンサー領域は myeloid zinc finger 1(MZF1)結合配列であることが推定された。ヒト(NM_001040181)、アカゲザル(NM_001265740)、マウス(NM_001252451)およびラット(NM_001006955)の

MZF1 結合配列を比較した結果、この配列が複数の生物種において高度に保存されていることが示された (Figure 18A)。推定 MZF1 結合配列に対する MZF1 の応答性を検討するために、野生型および変異型の MZF1 結合配列を含むレポーターベクター (pMZF1-Wt および pMZF1-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。pMZF1-Mt は、pMZF1-Wt と比べて、約 1.2 倍の有意な応答性の増加を示した (Figure 18B)。MZF1 結合配列に対する MZF1 結合性を検討するために、MZF1 を過剰発現させた HBEC を用いた ChIP 法により検討した。抗 MZF1 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 18C)。

CLDND1 転写に対する MZF1 の関与をさらに特徴づけるために、推定 MZF1 結合配列への MZF1 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。pMZF1-Wt と MZF1 発現ベクター (pMZF1) 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、2.0 倍の有意な増加を示した (Figure 19A)。それに対し、pMZF1-Wt と MZF1 を標的とする siRNA (siMZF1) の共発現における応答性は、コントロール (siGFP) と比べて、30% の有意な低下を示した (Figure 19B)。

MZF1 過剰発現およびノックダウンによる CLDND1 の発現レベル

CLDND1 の転写に MZF1 の関与が示されたため、MZF1 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。pMZF1 を用いた過剰発現における MZF1 および CLDND1 mRNA レベルは、コントロール (pCl-neo) と比べて、それぞれ 120 倍および 2.4 倍の有意な増加を示した (Figure 20A)。MZF1 および CLDND1 のタンパク質レベルにおいても mRNA レベルと同様に、コントロール (pSG5) と比べて、それぞれ 2.0 倍および 2.5 倍の有意な増加が示された (Figure 20B、C)。さらに、siRNA を介した MZF1 ノックダウンにおける MZF1 および CLDND1 mRNA レベルは、コントロール (siGFP) と比べて、それぞれ 79.8% および 67.0% の有意な低下を示した (Figure 21A)。MZF1 および CLDND1 のタンパク質レベルにおいても mRNA レベルと同様に、コントロール (siGFP) と比べて、それぞれ 39.4% および 50.4% の有意な低下が示された (Figure 21B、C)。

MZF1 ノックダウンによる細胞間の物質透過性

MZF1 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。siMZF1 による内因性 MZF1 ノックダウンは、コントロール (siGFP) と比べて、FITC-デキストランを添加後 30 分、60 分、90 分および 120 分において、それぞれ 2.4 倍、1.5 倍、1.2 倍および 1.3 倍の物質透過性の亢進を示した (Figure 22A)。さらに、透過性試験後における MZF1 および CLDND1 mRNA レベルを評価した結果、コントロール (siGFP) と比べて、それぞれ 31.4% および 23.2% の有意な低下が示された (Figure 22B)。

Table 3. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' - 3')
Luciferase reporter cloning (Mutated sequences are underlined)	
pCLDND1-FW(-308)	ATTCTACGCGTGGGAAATAAAATGGGTCAACG
pCLDND1-RV(+192)	AGCTGTCGACTCTAGCTCAGACCACAGCAC
pCLDND1-RV(+491)	GTTCGTCGACGCCGGACGCCTGCAGCAGCC
pCLDND1-RV(+686)	CCTTGTCGACGTTTCATGAAAACAGACTCGC
pCLDND1-RV(+891)	TCTCGTCGACTCCTCAGTGCAACATACGTC
pCLDND1-RV(+529)	CTCAGTCGACCTTAAAGGGTCCCAGCACTG
pCLDND1-RV(+609)	TAAGGTCGACGACAACGAAACTCAAAAAG
pMZF1-Wt-RV(+568)	TTTTGTCGACTTAAAAATCCCCCCTTCATC
pMZF1-Mt-RV(+568)	TTTTGTCGACTTAAAAATCCA <u>AC</u> CCTTCATC
pGVB2-FW	CAAGTGCAGGTGCCAGAAC
pGVB2-RV	CACCTCGATATGTGCATCTG
ChIP	
CLDND1-MZF1-FW	CAGTGCTGGGACCCTTTAAG
CLDND1-MZF1-RV	GACCGCACCAAACACCTTAC
siRNA experiments (Synthesized siRNA sequences are underlined)	
siMZF1-56-S-u	GATCACTAATACGACTCACTATAGGG <u>CTGTCATGGTGAAGCTAGATT</u>
siMZF1-56-S-d	AATCTAGCTTCACCATGACAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC
siMZF1-56-AS-u	GATCACTAATACGACTCACTATAGGG <u>TCTAGCTTCACCATGACAGTT</u>
siMZF1-56-AS-d	AACTGTCATGGTGAAGCTAGACCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC
siGFP-S-u	GATCACTAATACGACTCACTATAGGG <u>CAAGCTGACCCTGAAGTTCTT</u>
siGFP-S-d	AAGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC
siGFP-AS-u	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGA <u>AACTTCAGGGTCAGCTTGTT</u>
siGFP-AS-d	AACAAGCTGACCCTGAAGTTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC
qRT-PCR	
rtCLDND1-FW	CTAACTGAGCAGTTCATGGAG
rtCLDND1-RV	TAAGCTTCGGCAAATGCAAG
rtMZF1-FW	CCCGGAGATGGGTCACAGTC
rtMZF1-RV	GCATAGTCCTAGGAGGTGTC
rt18SrRNA-FW	CGATAACGAACGAGACTCTGG
rt18SrRNA-RV	TAGGGTAGGCACACGCTGAGC

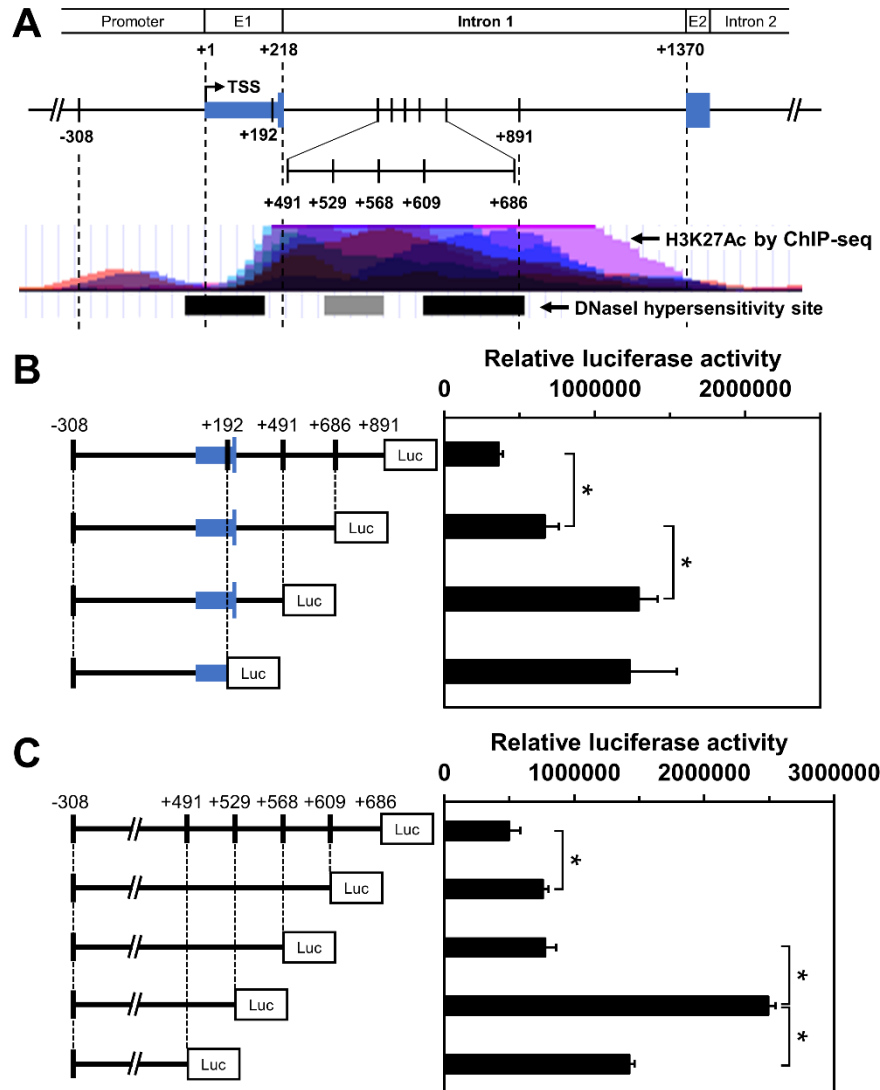


Figure 17. Evaluation of reporter activity using deletion mutants of the CLDND1 promoter region. (A) The putative promoter region of human CLDND1. The ENCODE project data in the UCSC Genome Browser were used to identify a distal site located within a DNase I hypersensitivity site (sensitivity: black boxes > grey box). A ChIP-seq assay (in which each color represents a different cell type, and the stronger the binding to the transcription factor is, the closer the color is to black) suggested that H3K27Ac is possibly involved in the enhancement of transcription. A luciferase reporter construct of the human CLDND1 promoter region amplified by PCR using the primers FW (−308) and RV (+192, +491, +529, +568, +609, +686, +891) is also shown. The construct contains the first exon (E1), including the transcription start site (TSS, position +1), and the first intron of CLDND1 (starting at +218). (B) Deletion mutants of +192 to +891 regions based on −308 to +891. (C) Deletion mutants of +491 to +686 regions based on −308 to +686. HBECs were transfected with a luciferase vector in which the CLDND1 promoter region was stepwise deleted, and the reporter activity was evaluated. Data are mean ± S.E. (n = 5). *P<0.01.

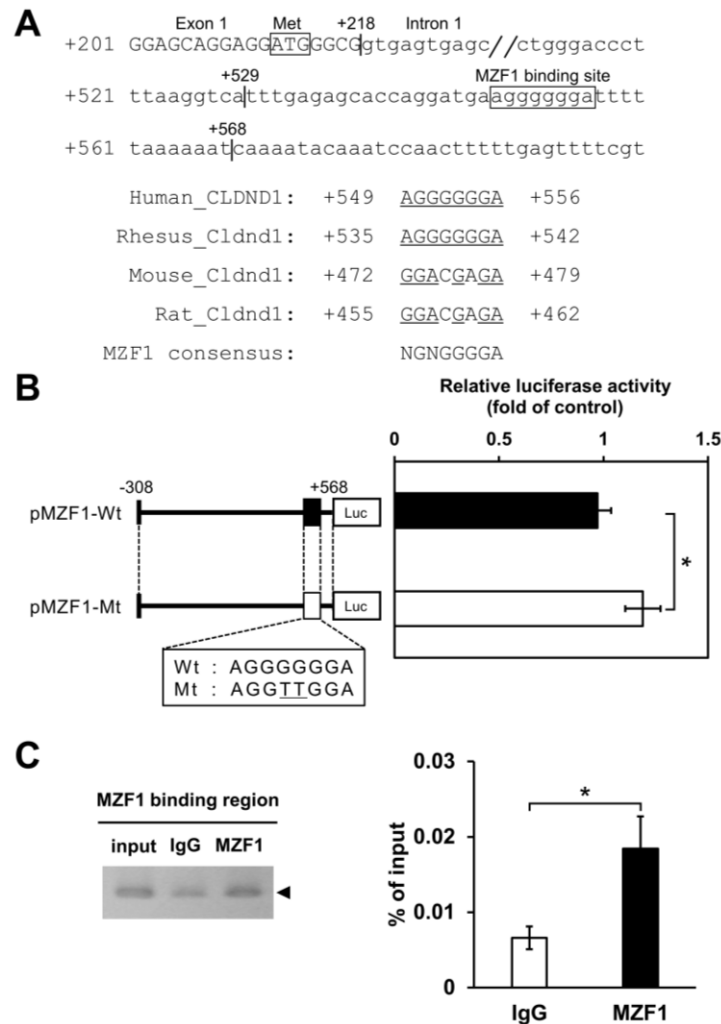


Figure 18. MZF1 responsiveness to the MZF1 binding site. (A) Schematic representation of the human CLDND1 promoter. Sequence analysis revealed the presence of a putative MZF1 binding site located at position +549 to +556 of the CLDND1 transcription start site (TSS,+1 to position). The exon region of human CLDND1 is capitalized, whereas the intron region is lowercased (Met, translational start codon). Alignment of the putative MZF1 binding sites in the human, rhesus monkey, mouse, and rat CLDND1 genes: the sequences of the putative MZF1 response elements are shown, with the conserved region of the MZF1-binding consensus sequence being underlined. (B) The reporter plasmids pMZF1-Wt, containing the wild-type (AGGGGGGA), and pMZF1-Mt, containing the mutated-type (AGGTIGGA, 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.

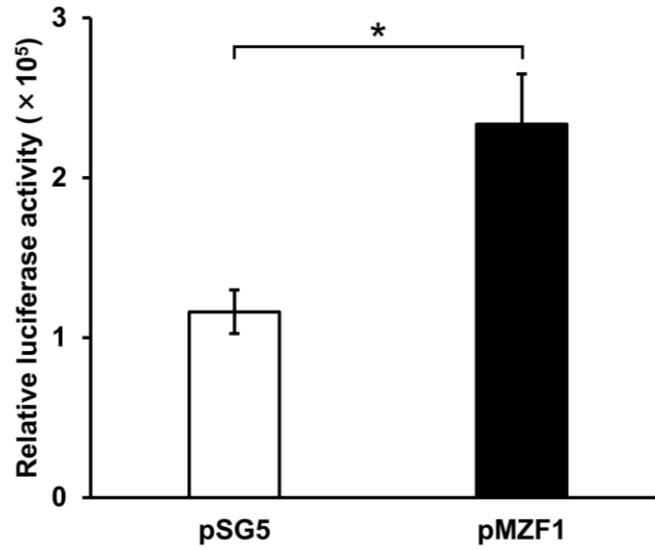
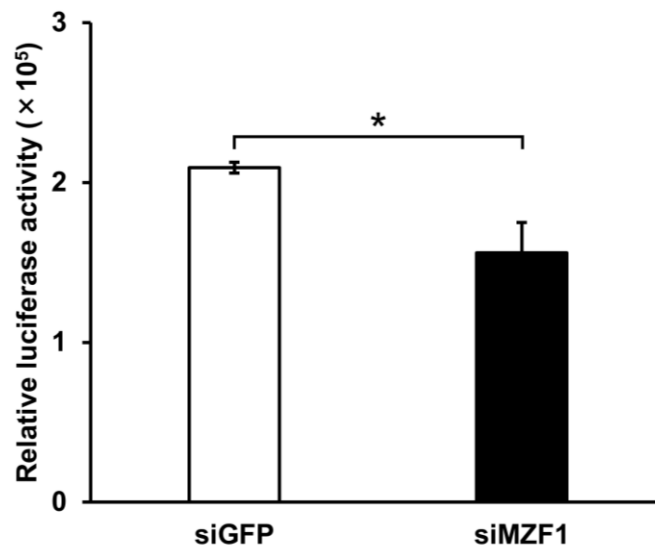
A**B**

Figure 19. Responsiveness of MZF1 and MZF1 binding sites to MZF1 expression level. (A) HBECs were transfected with an empty vector (pSG5) or an MZF1 expression vector (pMZF1) along with the reporter plasmid pMZF1-Wt. Data are mean \pm S.E. (n = 5). *P<0.01. (B) HBECs were transfected with 50 nM siRNA along with the reporter plasmid pMZF1-Wt. siRNA transfections were performed using siRNAs targeting coding regions of MZF1 (siMZF1). siRNA targeting green fluorescent protein (siGFP) was used as a negative control. Data are mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.01.

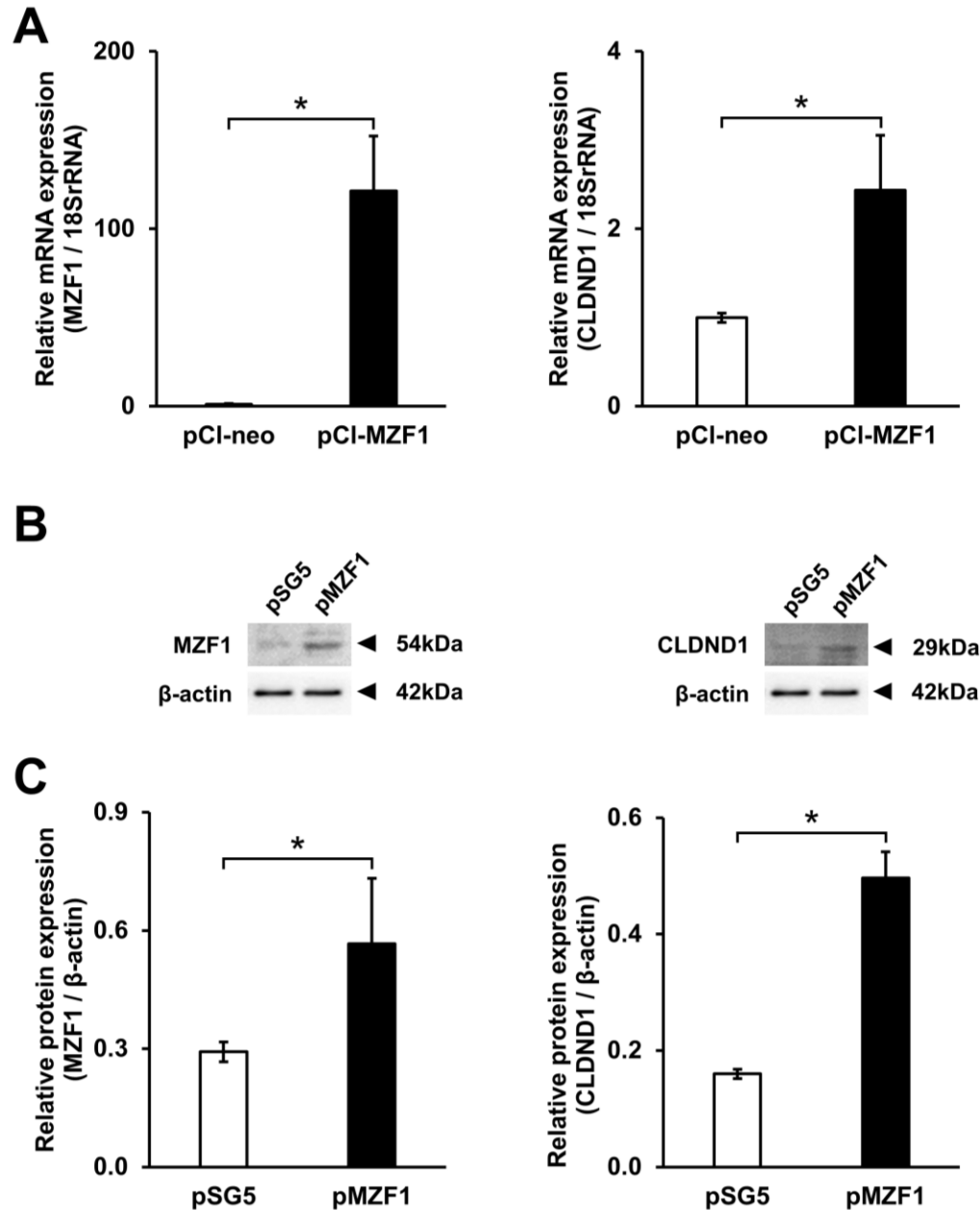


Figure 20. Expression level of CLDND1 with MZF1 overexpression in HBECs. (A) HBECs were transfected with an empty vector (pCI-neo) or an MZF1 expression vector (pCI-MZF1) for 72 hours. The expression levels of MZF1 and CLDND1 mRNA were analyzed by qRT-PCR and normalized to that of 18S rRNA. Data are 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.

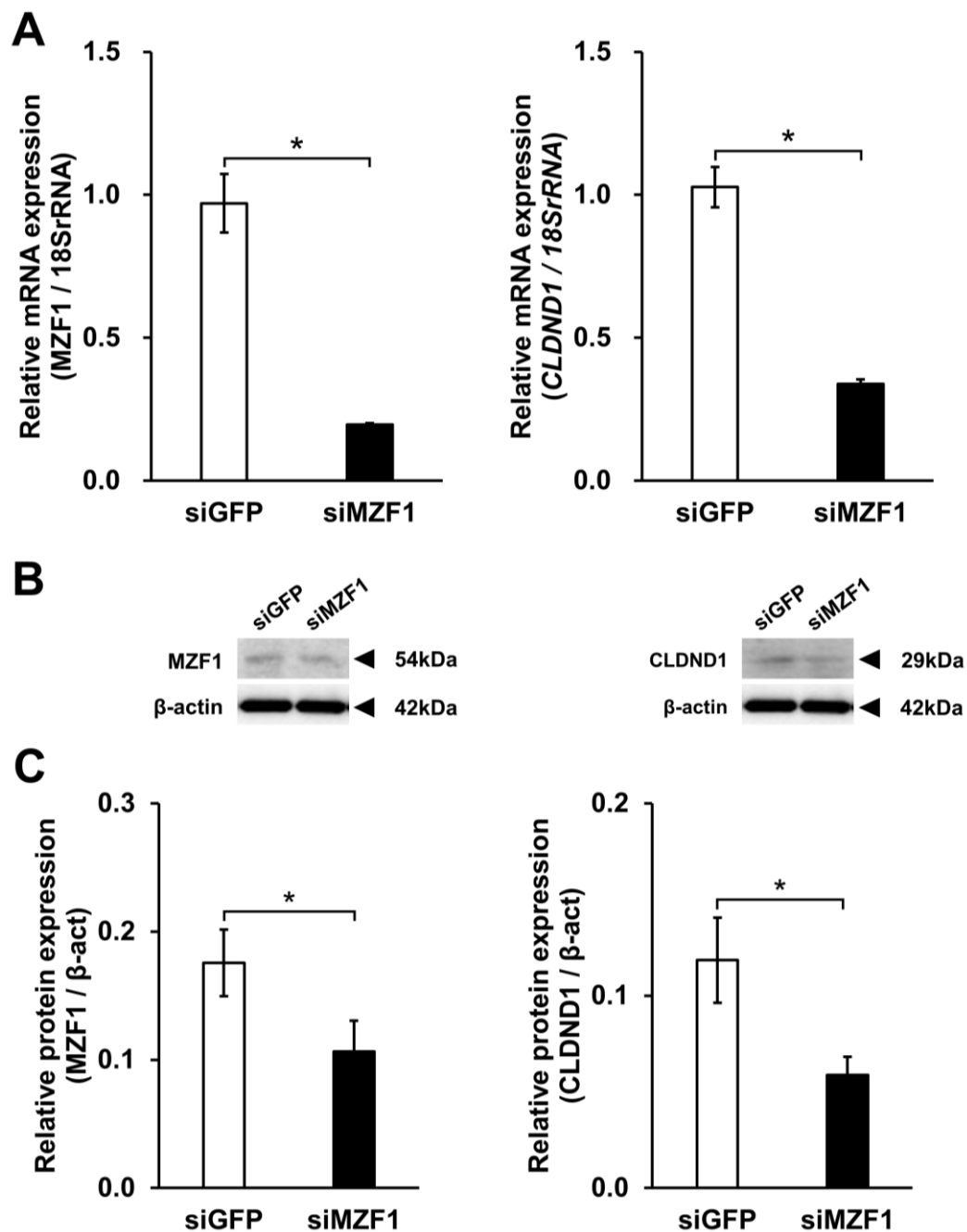


Figure 21. CLDND1 expression level upon MZF1 knockdown using siRNA in HBECs. HBECs were transfected with siGFP or siMZF1 for 48 hours. (A) The expression levels of MZF1 and CLDND1 mRNA were analyzed with qRT-PCR and normalized to that of 18S rRNA. Data are mean \pm S.E. (n = 5). *P<0.01. (B) Representative 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.

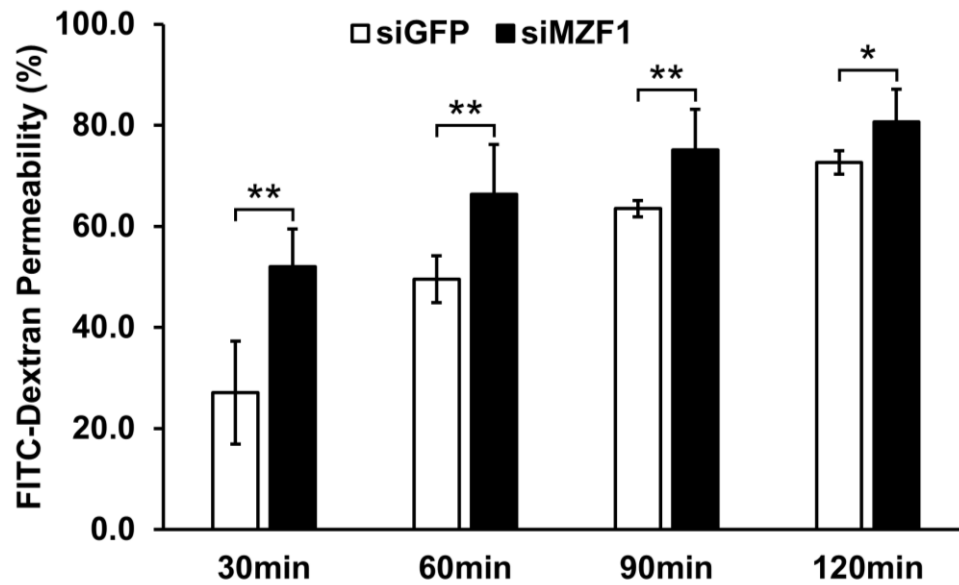
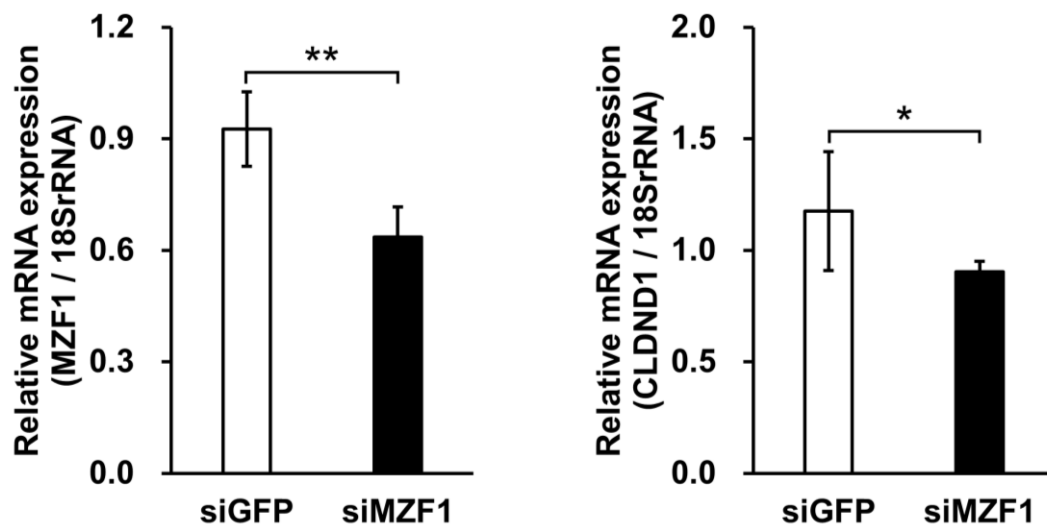
A**B**

Figure 22. Permeability of FITC-dextran in MZF1 knockdown. HBECs were transfected with siGFP or siMZF1 for 48 hours. (A) Effect of MZF1 knockdown on FITC-dextran permeability. Data are mean \pm S.E. (n = 6). *P<0.05. **P<0.01. (B) The expression of levels of MZF1 and CLDN1 mRNA were analyzed with qRT-PCR and normalized to that of 18S rRNA. Data are mean \pm S.E. (n = 6). *P<0.05. **P<0.01.

第4節 考察

第 1 章に記述したように、ROR α は CLDND1-RORE(-297 から-286)に結合し、CLDND1 の転写調節に関与していることが示された。しかし、遺伝子の転写調節は、複数の転写因子により相互作用を受けることが報告されている⁵⁷。そこで本章においては、CLDND1 の転写調節機構に対する新規転写因子の関与について検討した。

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 DNase I 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(Figure 17A)。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た。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。(Figure 17B、C)。

in silico 解析により、第 1 イントロンに存在するサイレンサー(+529 から+568)へ結合する転写因子として MZF1 を特定した。MZF1 は、ジンクフィンガー型転写因子であり、2つのコンセンサス配列 5'-AGTGGGGA-3'または 5'-CGGGNGAGGGGGAA-3'に結合し、遺伝子発現を調節する^{58,59}。今回、特定したサイレンサー領域は MZF1 コンセンサス配列と高い相同性を示した。また、ヒトからマウスまで高度に保存されており、CLDND1 転写調節に影響を及ぼすエレメントである可能性が示された(Figure 18A)。ルシフェラーゼレポーター解析の結果より、MZF1 結合配列に変異を導入すると、応答性の増加が示された(Figure 18B)。さらに、ChIP 法により MZF1 が CLDND1 の第 1 イントロン中の MZF1 結合配列に結合することが示された(Figure 18C)。MZF1 は、細胞内環境に応じて、さまざまな遺伝子の転写活性化因子(アクチベーター)および転写抑制化因子(リプレッサー)として機能する。例えば、細胞増殖や分化の制御に関わる AXL、免疫細胞のマーカー分子である CD11b および CD14 などの遺伝子に対してはアクチベーターとして機能し^{60,61}、c-myc や I 型インスリン様成長因子受容体など遺伝子に対してはリプレッサーとして機能することが報告されている^{62,63}。これらの結果から、MZF1 は CLDND1 のサイレンサーに対してもリプレッサーとして機能することが考えられる。

ルシフェラーゼレポーター解析の結果より、MZF1 過剰発現は、応答性の増加を示した。それに対し、siRNA を介した MZF1 ノックダウンは、応答性の低下を示した (Figure 19)。これらの結果は、MZF1 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。過剰発現による MZF1 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 20)。さらに、siRNA による MZF1 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 21)。これらのことから、CLDND1 の転写調節は MZF1 の発現レベルに依存していることが示唆された。透過性試験において MZF1 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 22)。これらの結果から、MZF1 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^{64,65}。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。

第5節 小括

本章における検討により以下の知見が得られた。

1. CLDND1 第 1 イントロン領域の+529 から+568 中に MZF1 結合配列を含むサイレンサーが示された。
2. MZF1 は CLDND1 第 1 イントロン領域中の MZF1 結合配列に結合し、促進的に作用することが示された。
3. MZF1 過剰発現において、CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルの増加を生じることが示された。
4. siRNA を介した MZF1 のノックダウンは、CLDND1 mRNA およびタンパク質レベルの低下を引き起こし、細胞間の物質透過性を亢進することが示された。

以上の結果から、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)に結合することにより、CLDND1 の発現調節に対し促進的に作用していることが明らかとなった(Figure 23)。

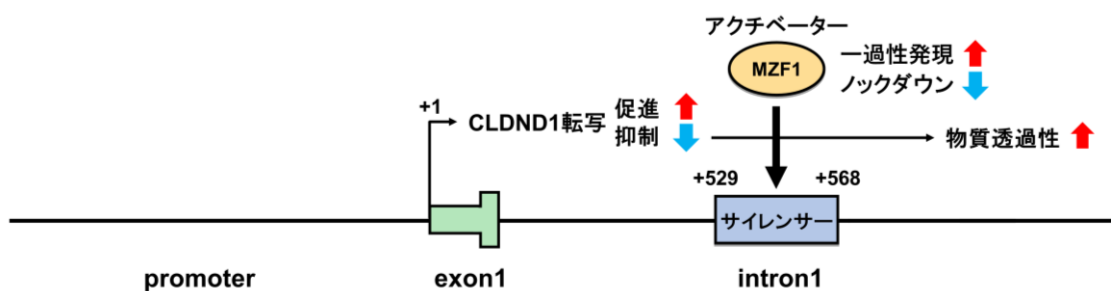


Figure 23. CLDND1 第 1 イントロンのサイレンサーに対する MZF1 の発現調節機構

第 4 章 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

第1節 序論

第 3 章で記述したように、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。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調節されている。そこで本章においては、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。初めに、CLDND1 の推定プロモーター上流領域(-1017 から+192)を段階的に欠失させた応答配列について評価した。それにより同定した転写調節配列に結合する転写因子を検索した結果、MZF1 および Specificity Protein 1 (SP1) の関与が示されたため、MZF1 および SP1 の応答性および結合性を評価した。次に、MZF1 および SP1 の過剰発現における CLDND1 mRNA レベルを評価した。さらに、プロモーター上流のエンハンサーおよび第 1 イントロンのサイレンサーに対する MZF1 応答性の強度について比較した。

第2節 実験方法

第1項 細胞培養

HBEC の培養は、第 1 章の第 2 節、第 1 項と同様の操作で行った。

第2項 レポーターベクターの構築

ヒト CLDND1 プロモーター領域の-1017 から+192 を基準とし、段階的な欠失 DNA 断片は Table 4 に示すプライマーを用いて PCR により増幅した。その DNA 断片を Mlu I /Sal I で処理し、pGVB2 ベクターの Mlu I /Xho I 部位に挿入した。プラスミドのシーケンス解析および精製は、第 1 章の第 2 節、第 6 項と同様の操作で行った。また、プロモーター領域または第 1 イントロン領域の 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 (pMZF1x3-promoter および pMZF1x3-intron) は、MZF1 結合配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖として Table 4 に示す相補的なオリゴヌクレオチドにより、第 1 章の第 2 節、第 6 項と同様の操作で調製した。

第3項 トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定

トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定は、第 3 章の第 2 節、第 3 項と同様の操作で行った。過剰発現は、100 ng MZF1 発現ベクター (pMZF1 または pCl-MZF1)、SP1 発現ベクター (pSP1) またはコントロールベクター (pSG5 または pCl-neo) をコトランスフェクションした。

第4項 ChIP 法

HBEC を 4.0×10^5 cell/well で 6well に播種し、90%コンフルエンスになるまで一晩培養後、500 ng ルシフェラーゼレポーターベクター (CLDND1 の-1017 から+192 を含む) と pMZF1 または pSP1 をそれぞれコトランスフェクションした。14 時間後に、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換後、さらに 72 時間培養した。免疫沈降反応は、抗 MZF1 抗体、抗 SP1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または非免疫 IgG 抗体を用いて、第 2 章の第 2 節、第 2 項と同様の操作で行った。相対的結合強度は、第 3 章の第 2 節、第 4 項と同様の操作で算出した。用いたプライマーは Table 4 に

示す。

第5項 qRT-PCR

逆転写および qRT-PCR は Table 4 に示すプライマーを用いて、第 1 章の第 2 節、第 5 項と同様の操作で行った。

第6項 過剰発現

HBEC を 2.0×10^5 cell/well で播種し、一晚培養後、Lipofectamine 2000 を用いて 500 ng MZF1 発現ベクター (pCI-MZF1)、pSP1 またはコントロールベクター (pSG5 または pCI-neo) をトランスフェクションした。12-16 時間後に、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換し、さらに 72 時間培養した。

第7項 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差 (SE) で示した ($n = 3-6$)。2 群間の比較は、Student's *t*-test を行い、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとして解析した。

第3節 結果

CLDND1 プロモーター領域(-1017 から+192)の欠失レポーターに対する応答性

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ルシフェラーゼレポーター解析により検討した。初めに、-1017 から+192 の領域を基準とした段階的欠失レポーターベクターを用いて応答性を評価した。プロモーター領域において-734 までの欠失による応答性は、欠失前の-778 と比べて、約 50%の有意な低下を示した(Figure 24A)。さらに、応答性を示す領域を絞り込むために、-778 から+192 の領域を基準とした段階的欠失レポーターベクターを用いて評価した。プロモーター領域において-734 までの欠失による応答性は、欠失前の-742 と比べて、約 40%の有意な低下を示した(Figure 24B)。以上の結果より、CLDND1 プロモーター上流領域中の-742 から-734 領域に転写促進配列(エンハンサー)の存在が示された。

エンハンサーに対する MZF1 および SP1 の応答性と結合性

エンハ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した。この領域は、MZF1(TCCCCNCN [N;A、T、G、または C])および SP1(WCCCRGCCCCRC[W;A または T、R;A または G])のコンセンサス配列とそれぞれ 87.5%および 70%の相同性を示した。この領域に存在する MZF1 および SP1 結合配列は、アカゲザル、マウスおよびラットにおいても 50%以上の割合で保存されていた(Figure 25B)。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 26A; *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 26C)。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 26B,D)。

MZF1 および SP1 過剰発現における CLDND1 の mRNA レベル

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。その結果、第 3 章の第 3 節と同様に MZF1 過剰発現における MZF1 および CLDND1 mRNA レベルは、コントロールと比べて、それぞれ 160 倍および 1.6 倍の有意な増加を示した(Figure 27A)。一方、SP1 過剰発現において SP1 mRNA レベルは 6.4 倍の有意な増加を示した。それに対して、CLDND1 mRNA レベルは有意な変化を示さなかった(Figure 27B)。

エンハンサーとサイレンサー中の MZF1 結合配列に対する MZF1 の応答性の比較

本章で同定したプロモーター上流領域のエンハンサーおよび第 3 章で同定した第 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および第 1 イントロン領域のサイレンサーの応答性は、コントロールと比べて、それぞれ 2.2 倍および 1.7 倍の有意な増加を示した(Figure 28)。プロモーター上流領域のエンハンサーの応答性は、第 1 イントロン領域のサイレンサーと比べて、1.4 倍の有意な増加を示した(データ未掲載)。

Table 4. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' - 3')
Luciferase reporter cloning	
pCLDND1-FW(-1017)	GCATACGCGTATCAGTTTCACCCACTCAGG
pCLDND1-FW(-827)	GTCACGCGTTCAGCTTTCTCTGTCGGTTAC
pCLDND1-FW(-778)	CATACGCGTGTCCCAGGCCACGTTAATAG
pCLDND1-FW(-734)	GTCACGCGTTCCTGTCCATGAATTTCTGTG
pCLDND1-FW(-678)	GAAACGCGTTTGCCCCTGTGCCACACATC
pCLDND1-FW(-660)	ATCTGCGAGCTCCAATGCTGTCCATGACCTTATCTGCTTG
pCLDND1-FW(-762)	GCGACGCGTCTCATGTTATTGTTAAGATG
pCLDND1-FW(-742)	GCGACGCGTTCCCTGCTTCCTGTCCATG
pCLDND1-RV(+192)	AGCTGTGCGACTCTAGCTCAGACCACAGCAC
Promoter-sense	TAAGATGTCCCTGCTTCCTGTC
Promoter-antisense	GACAGGAAGCAGGGACATCTTA
Intron-sense	GGATGAAGGGGGGATTTTTT
Intron-antisense	AAAAAATCCCCCCTTCATCC
ChIP	
promoter - ChIP-FW	CCTCTGGTCCTTGAGTCAGC
promoter - ChIP-RV	CAGATAAGGTCATGGACAGC
Intron - ChIP-FW	CAGTGCTGGGACCCTTTAAG
Intron - ChIP-RV	GACCGCACCAAACACCTTAC
qRT-PCR	
rtCLDND1-FW	CTAACTGAGCAGTTCATGGAG
rtCLDND1-RV	TAAGCTTCGGCAAATGCAAG
rtMZF1-FW	CCCGGAGATGGGTCACAGTC
rtMZF1-RV	GCATAGTCCTAGGAGGTGTC
rtSP1-FW	CAGCACAGGCAGTAGCAGCAG
rtSP1-RV	GGAGTTGTTGCTGTTCTCATTGG
rt18SrRNA-FW	CGATAACGAACGAGACTCTGG
rt18SrRNA-RV	TAGGGTAGGCACACGCTGAGC

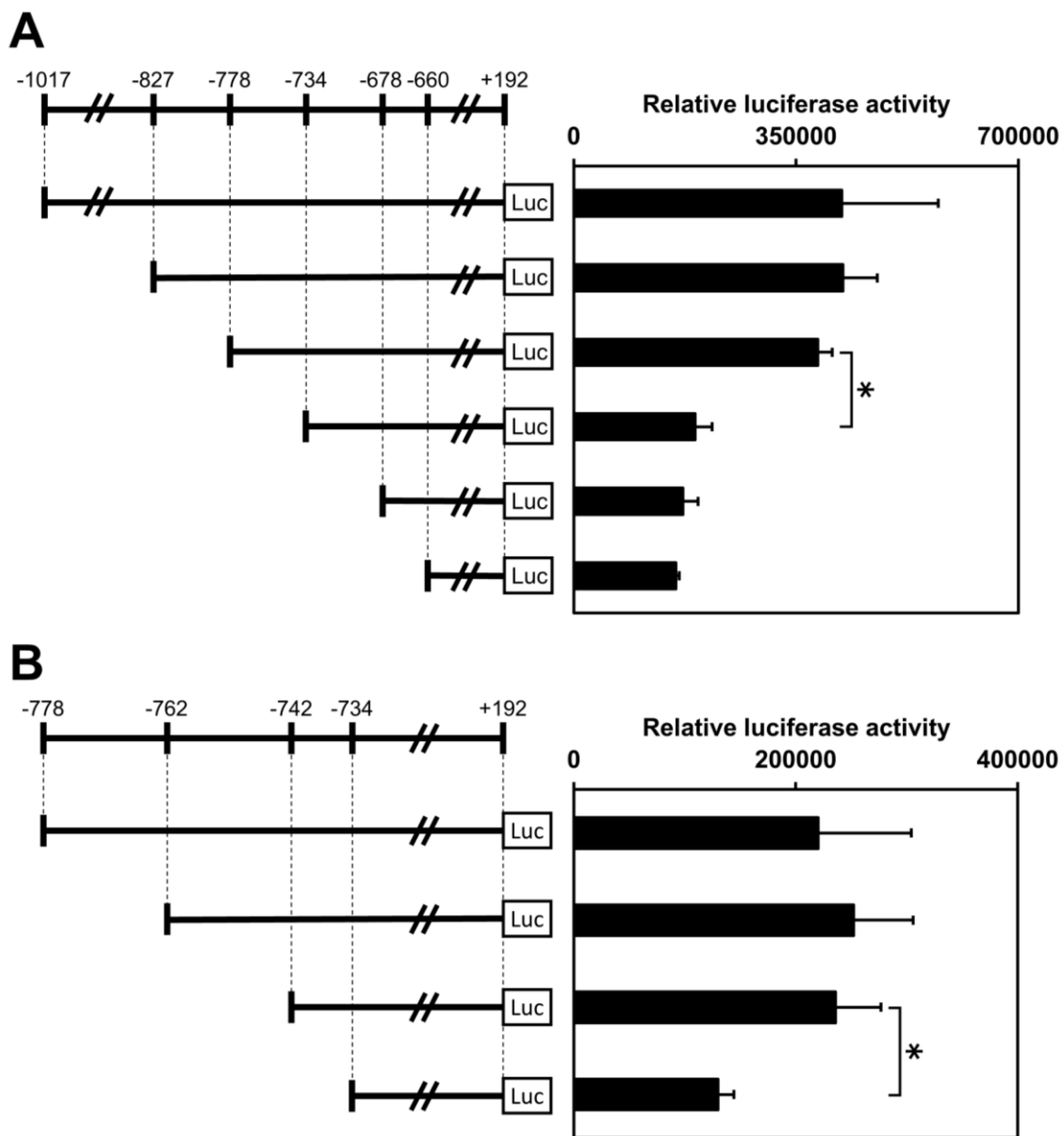


Figure 24. Transcriptional activity of the promoter region of human CLDND1. Human brain endothelial cells (HBECS) were transfected with luciferase vectors carrying stepwise deletion mutants of CLDND1 promoter region and evaluated for reporter activity. **(A)** Deletion mutants of -1017 to -660 regions 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 ($n = 3$). * $P < 0.05$.

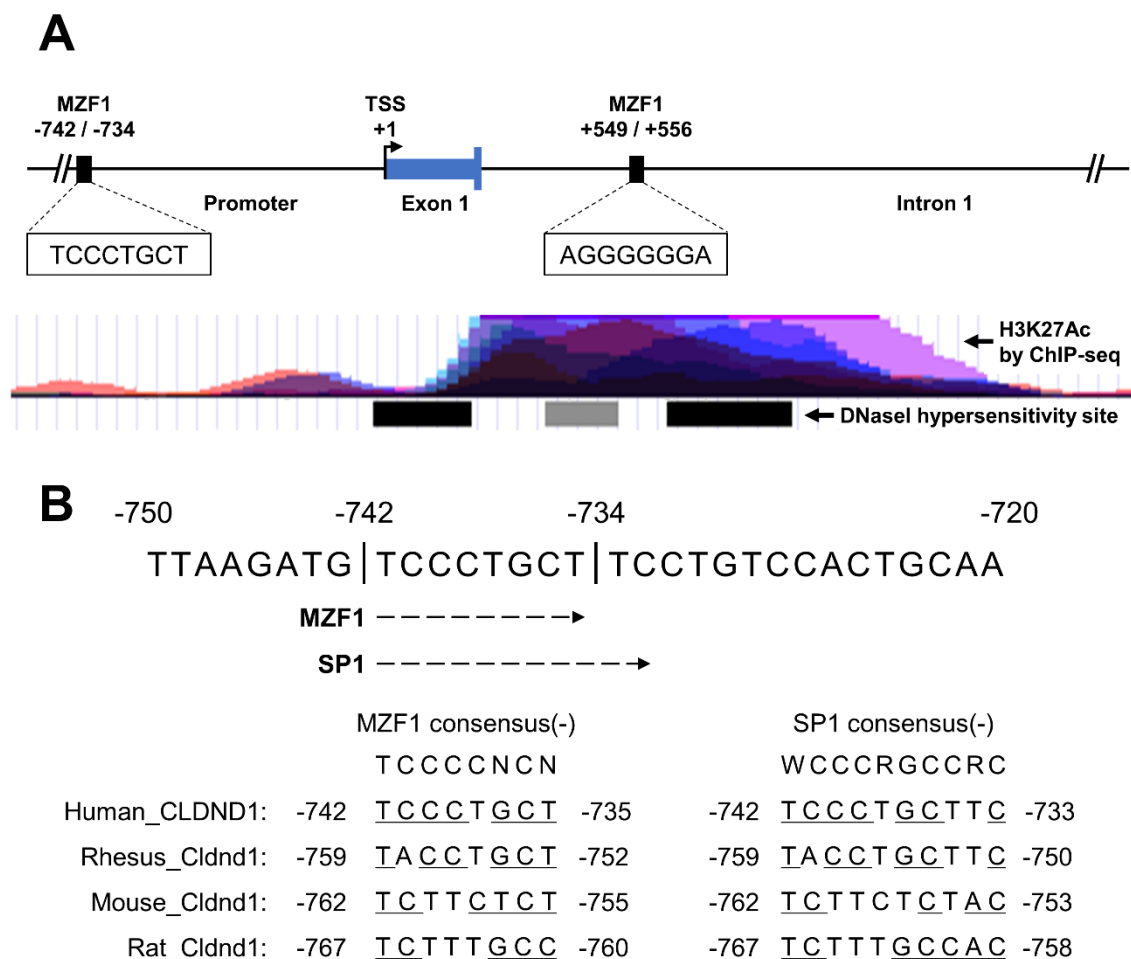


Figure 25. MZF1- and SP1-binding sites in the human CLDND1 promoter region. (A) The results of the DNase I susceptibility test (sensitivity: black boxes > grey box) and the chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) assay for H3K27Ac (each color represents a different cell type; the stronger the binding to the transcription factor, darker is the color) are shown integrated in the ENCODE project data in the UCSC Genome Browser. The transcription start point is +1 and the estimated MZF1-binding sites in the first intron and promoter region are shown. (B) Sequence of human CLDND1 promoter region -750 to -720. Alignment of the putative MZF1- and SP1-binding sites on CLDND1 in humans, rhesus monkeys, mice, and rats. The sequences of the putative response elements are shown, and the conserved region of the binding consensus sequence is underlined.

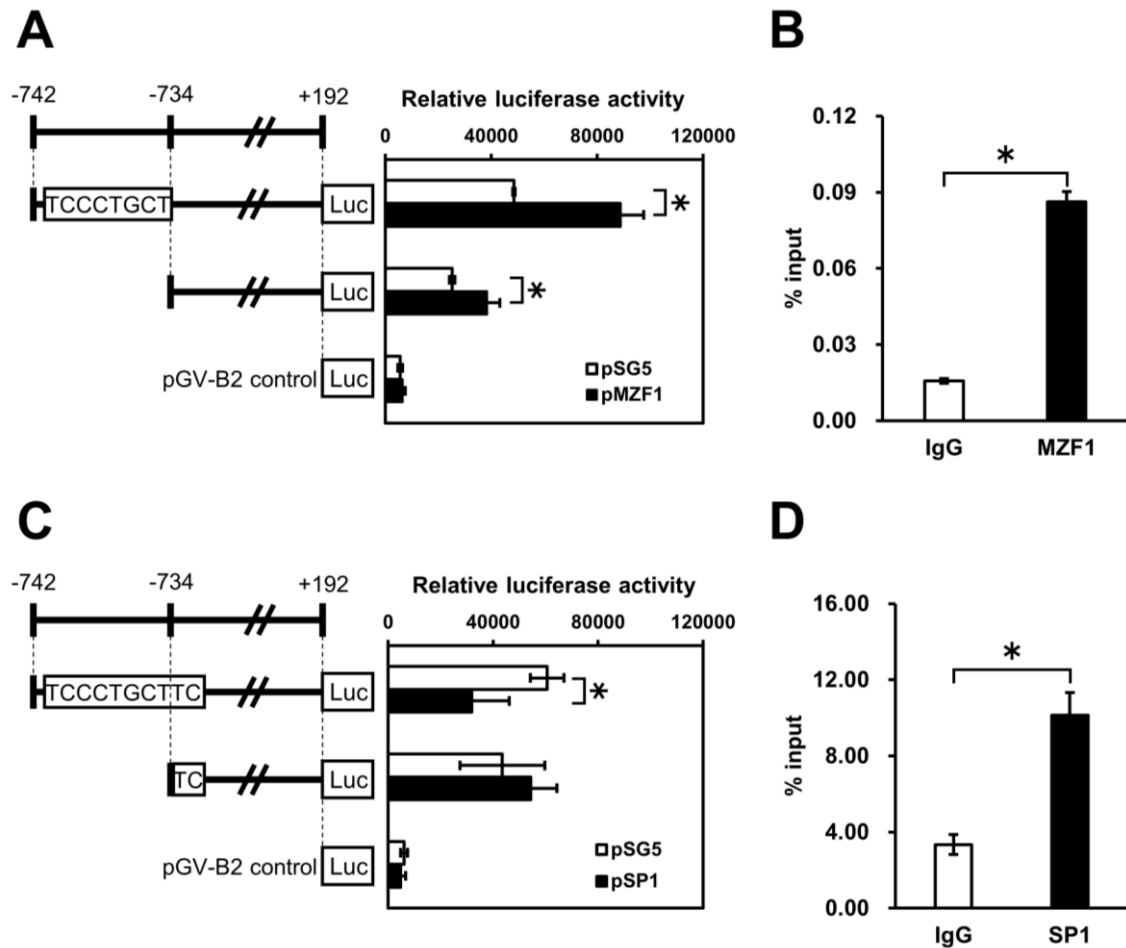


Figure 26. Evaluation of MZF1 and SP1 responsiveness to enhancer sequences in the CLDND1 promoter region. (A, C) Assessment of MZF1 and SP1 responsiveness to enhancer regions. Human brain endothelial cells (HBECs) were co-transfected with a luciferase reporter vector ligated from -742 to +192 regions 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 ($n = 6$). * $P < 0.05$.

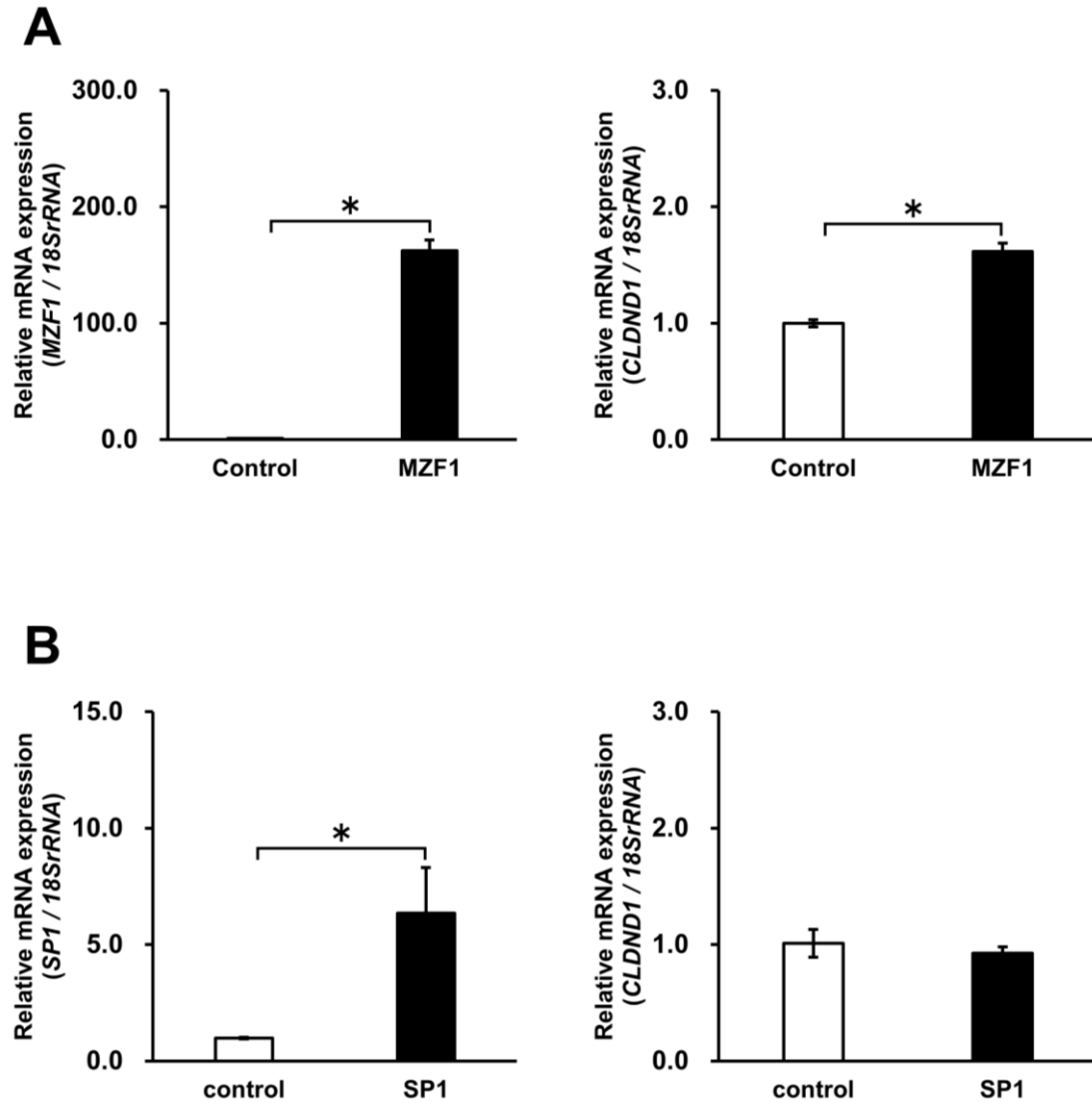


Figure 27. Human CLDND1 expression following overexpression of MZF1 and SP1. (A) Human brain endothelial cells (HBECs) were transfected with an empty vector (pCl-neo) or an MZF1-expressing vector (pCl-MZF1) for 72 hours. (B) HBECs were transfected with an empty vector (pSG5) or an SP1-expressing vector (pSP1) for 72 hours. The expression of each mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR and normalized to that of 18S rRNA. Data are expressed as mean \pm standard error ($n = 5$). * $P < 0.05$.

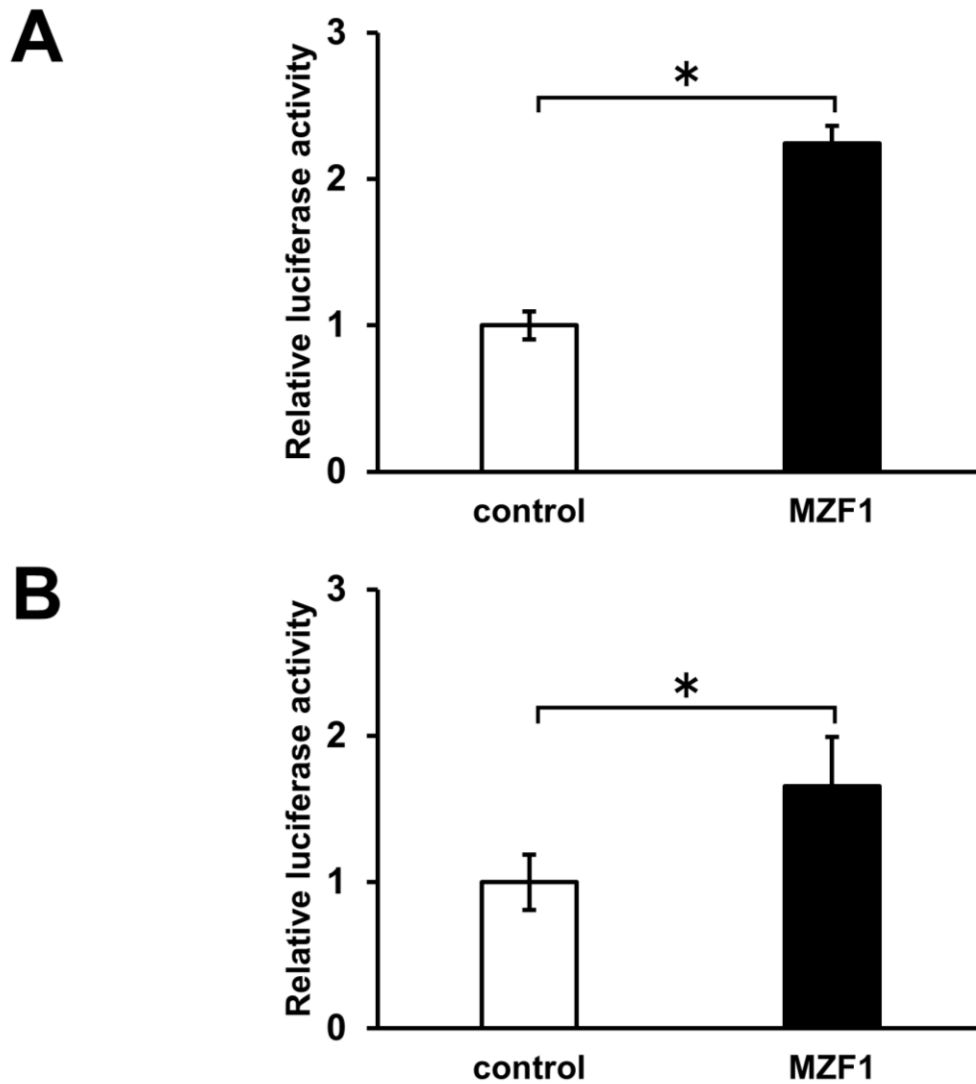


Figure 28. Comparison of MZF1-binding capacity to the promoter and first intron sites. Human brain endothelial cells (HBECs) were co-transfected with an empty vector or MZF1-expressing vector with a luciferase reporter plasmid containing the MZF1-binding sequence of the promoter site (**A**) or the first 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 ($n = 4-5$). * $P < 0.05$.

第4節 考察

第3章に記述したように、CLDND1 第1イントロンの MZF1 結合部位はサイレンサー領域に存在していた。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、本章においては CLDND1 のプロモーター上流領域に着目し、転写調節機構の解明を試みた。

プロモーター上流領域の応答性は、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 24)。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(Figure 25A)。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 SP1 を特定した。ヒト、アカゲザル、マウスおよびラットのエンハンサー中の MZF1 および SP1 コンセンサス配列の相同性を比較した結果、ヒトにおいて MZF1 および SP1 結合配列は、高い相同性を示した(Figure 25B)。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 26)。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(Figure 27)。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。

ルシフェラーゼレポーター解析の結果より、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 28)。さらに、エンハンサーおよびサイレンサーに対する MZF1 の結合性について本章および第 3 章の ChIP 法の比較により検討した。抗 MZF1 抗体を用いたエンハンサーおよびサイレンサーの免疫沈降量は、非免疫 IgG 抗体と比べてそれぞれ 5.5 倍および 2.8 倍であった(Figure 26)。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、第 3 章で記述したように、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、通常の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。

第5節 小括

本章における検討により以下の知見が得られた。

1. CLDND1 プロモーター上流領域の-742 から-734 中に MZF1 および SP1 結合配列を含むエンハンサーが示された。
2. エンハンサー領域(-742 から-734)に対する MZF1 および SP1 は、それぞれ促進(アクチベーター)および抑制(コンペティター)的に作用することが示された。
3. MZF1 および SP1 過剰発現は、CLDND1 mRNA レベルに対して、それぞれ増加(アクチベーター)および変化をしない(コンペティター)ことが示された。
4. MZF1 過剰発現においてプロモーター上流領域のエンハンサーは、第 1 イントロンのサイレンサーと比べて、強く作用することが示された。

以上の結果から、CLDND1 プロモーター上流領域のエンハンサーに MZF1 と SP1 が結合し、アクチベーターである MZF1 の強い結合性および応答性により、CLDND1 の転写調節に対して促進的に作用することが明らかとなった(Figure 29)。

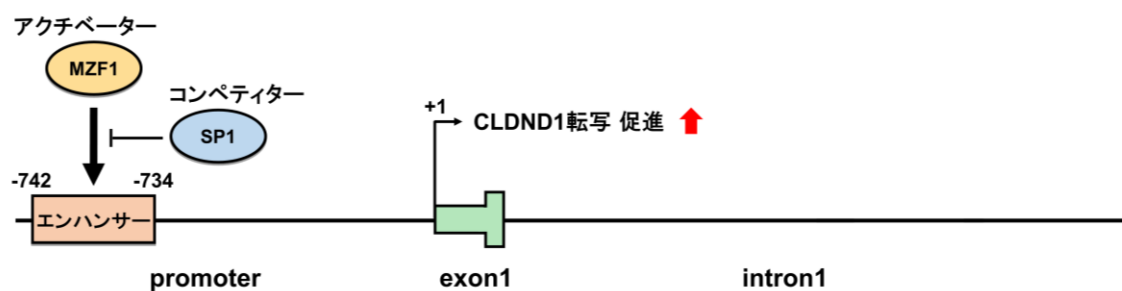


Figure 29. CLDND1 プロモーター上流のエンハンサーに対する MZF1 と SP1 の転写調節機構

総括

脳血管内皮細胞における細胞接着分子 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²³。

本研究では、CLDND1 の発現調節機構および機能について検討した。Figure 30 に示すように、第 1 章において、ROR α は CLDND1 プロモーター領域のエンハンサーである 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。第 2 章において、ROR α を介した CLDND1 の発現調節に対して ROR α リガンドであるコレステロール類の影響を検討した。その結果、ロバスタチンによるコレステロール類の低下は、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。しかし、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。そこで第 3 章において、新規転写因子の関与について検討した結果、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。また、MZF1 の発現低下は、細胞間の物質透過性を亢進させることも明らかにした。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の影響が強いと考えられる。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、第 4 章では CLDND1 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 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。

本研究において著者は、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を解明した。Figure 31 に示すように、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 CLDND1 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、CLDND1 や CDH 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。本研究の知見

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。

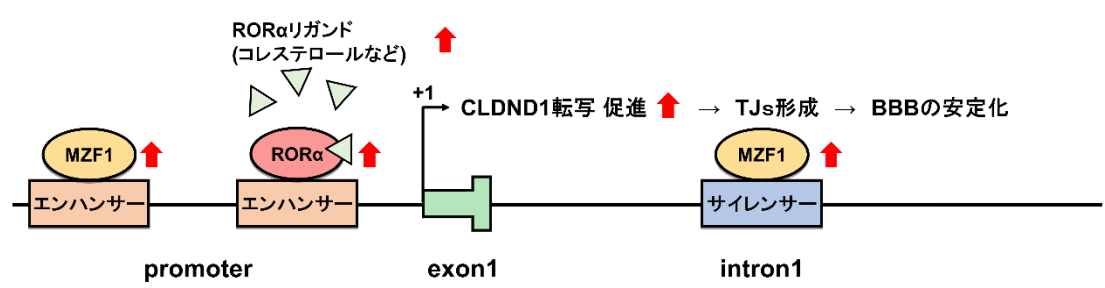


Figure 30. BBBの安定化に対するCLDN1の発現調節機構

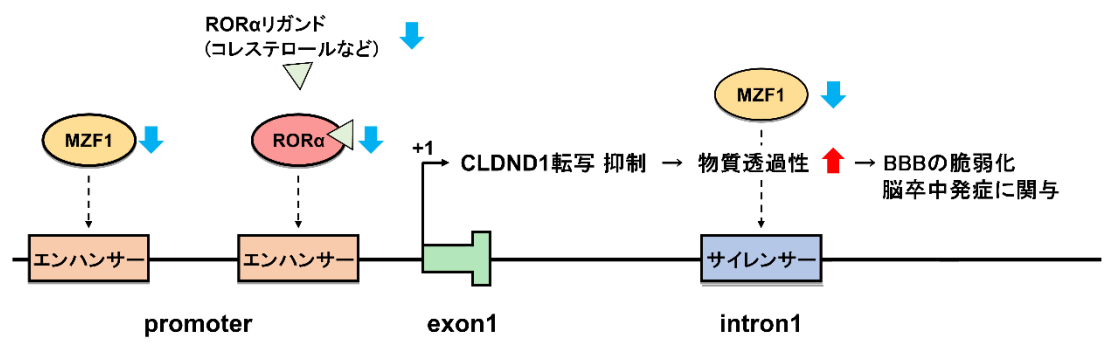


Figure 31. BBBの脆弱化に対するCLDN1の発現調節機構

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教授 道原明宏博士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。本研究を実施する機会を与えていただき、その遂行にあたって終始ご指導をいただいた道原明宏博士に深謝いたします。

また、本研究進行中に、実験の指導や日常の議論を通じて多くの知識や示唆をいただいた福山大学 薬学部 病態生理・ゲノム機能学研究室講師 松岡浩史博士に深謝いたします。そして、実験の実施に際してご協力とご助言をいただいた病態生理・ゲノム機能学研究室の皆様にも深謝いたします。

最後に、本論文の審査にあたり有益なるご指導、ご助言をいただきました福山大学 薬学部 衛生薬学研究室教授 竹田修三博士、薬物治療学研究室教授 井上敦子博士、臨床薬効解析学研究室教授 佐藤雄己博士に深謝いたします。

引用文献

1. 森興太, 岡田靖. 脳卒中の発症予防. 神経治療学. 2019;36(2):62–6.
2. Noda H, Iso H, Irie F, Sairenchi T, Ohtaka E, Doi M, et al. Low-density lipoprotein cholesterol concentrations and death due to intraparenchymal hemorrhage: the ibaraki prefectural health study. *Circulation*. 2009;120(25):445–57.
3. Iso H, Jacobs DR, Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD. Serum Cholesterol Levels and Six-Year Mortality from Stroke in 350,977 Men Screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *N Engl J Med*. 1989;320(14):904–10.
4. Patel A. Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. *Int J Epidemiol*. 2003;32(4):563–72.
5. Iso H, Imano H, Yamagishi K, Ohira T, Cui R, Noda H, et al. Fasting and non-fasting triglycerides and risk of ischemic cardiovascular disease in Japanese men and women: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Atherosclerosis*. 2014;237(1):361–8.
6. Mirzaei M, Truswell AS, Arnett K, Page A, Taylor R, Leeder SR. Cerebrovascular disease in 48 countries: Secular trends in mortality 1950-2005. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(2):138–45.
7. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: Expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*. 2006;6(186). doi:10.1186/1471-2407-6-186.
8. Nakano M, Eguchi K, Sato T, Onoguchi A, Hoshida S, Kario K. Effect of Intensive Salt-Restriction Education on Clinic, Home, and Ambulatory Blood Pressure Levels in Treated Hypertensive Patients During a 3-Month Education Period. *J Clin Hypertens*. 2016;18(5):385–92.
9. Ueshima H. Explanation for the Japanese paradox: Prevention of increase in coronary heart disease and reduction in stroke. *J Atheroscler Thromb*. 2007;14(6):278–86.
10. Cui R, Iso H, Yamagishi K, Saito I, Kokubo Y, Inoue M, et al. High serum total cholesterol levels is a risk factor of ischemic stroke for general Japanese population: The JPHC study. *Atherosclerosis*. 2012;221(2):565–9.
11. 厚生労働省. 介護の状況. 2019年 国民生活基礎調査の概況. 2019.
12. Asada T. 都市部における認知症有病率と認知症の生活機能への対応 平成23年度～24年度 総合研究報告書. 厚生労働科学研究費補助金認知症対策総合研究事業. 2013.
13. 厚生労働省. 平成29年度 国民医療費の概況. 2017.
14. 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.
15. Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(3):169–82.
 16. Hademenos GJ, Massoud TF. Biophysical mechanisms of stroke. *Stroke.* 1997;28(10):2067–77.
 17. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol.* 2015;209(4):493–506.
 18. Claesson-Welsh L. Vascular permeability - The essentials. *Ups J Med Sci.* 2015;120(3):135–43.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:403–29.
 22. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013;93(2):525–69.
 23. 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. (参考文献:3)
 24. Matsuoka H, Tamura A, Kinehara M, Shima A, Uda A, Tahara H, et al. Levels of tight junction protein CLDN1 are regulated by microRNA-124 in the cerebellum of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;498(4):817–23. (参考文献:4)
 25. Shigetomi K, Ono Y, Inai T, Ikenouchi J. Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition. *J Cell Biol.* 2018;217(7):2373–81.
 26. 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.
 27. 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.

28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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*. 2015;10(9):1–11. (参考文献:1)
33. Chopra AR, Louet JF, Saha P, An J, DeMayo F, Xu J, et al. Absence of the SRC-2 coactivator results in a glycogenopathy resembling Von Gierke's disease. *Science*. 2008;322(5906):1395–9.
34. 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). doi: 10.4172/2155-9929.1000219.
35. Kent WJ. BLAT---The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Res*. 2002;12(4):656–64.
36. Miki N, Ikuta M, Matsui T. Hypoxia-induced Activation of the Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor α 4 Gene by an Interaction between Hypoxia-inducible Factor-1 and Sp1. *J Biol Chem*. 2004;279(15):15025–31.
37. Hao N, Lee KL, Furness SGB, Bosdotter C, Poellinger L, Whitelaw ML. Xenobiotics and loss of cell adhesion drive distinct transcriptional outcomes by aryl hydrocarbon receptor signaling. *Mol Pharmacol*. 2012;82(6):1082–93.
38. Suzuki A, Kawano S, Mitsuyama T, Suyama M, Kanai Y, Shirahige K, et al. DBTSS/DBKERO for integrated analysis of transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D229–38.
39. Lusska A, Shen E, Whitlock JP. Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. *JBiolChem*. 1993;268(9):6575–80.

40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Wang Y, Kumar N, Solt LA, Richardson TI, Helvering LM, Crumbley C, et al. Modulation of retinoic acid receptor-related orphan receptor α and γ activity by 7-oxygenated sterol ligands. *J Biol Chem.* 2010;285(7):5013–25.
44. Wang Y, Kumar N, Crumbley C, Griffin PR, Burris TP. A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of ROR α and ROR γ activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2010;1801(8):917–23.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Michihara A, Akasaki K, Yamori Y, Tsuji H. Change in the protein level of mevalonate pyrophosphate decarboxylase in tissues of mouse by pravastatin. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(8):1082–5.
50. Tanaka H, Ueda Y, Hayashi M, Date C, Baba T, Yamashita H, et al. Risk factors for cerebral hemorrhage and cerebral infarction in a japanese rural community. *Stroke.* 1982;13(1):62–73.
51. Benfante R, Yano K, Hwang LJ, Curb JD, Kagan A, Ross W. Elevated serum

- cholesterol is a risk factor for both coronary heart disease and thromboembolic stroke in hawaiian japanese men implications of shared risk. *Stroke*. 1994;25(4):814–20.
52. Yano K, Reed DM, MacLean CJ. Serum cholesterol and hemorrhagic stroke in the honolulu heart program. *Stroke*. 1989;20(11):1460–5.
 53. Yamori Y. Predictive and Preventive Pathology of Cardiovascular Diseases. *Pathol Int*. 1989;39(11):683–705.
 54. K. Okamoto, Y. Yamori, A. Nagaoka. Establishment of the stroke prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res*. 1974;34:143–53.
 55. Iritani N, Fukuda E, Nara Y, Yamori Y. Lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Atherosclerosis*. 1977;28(3):217–22.
 56. Katayama M, Matsuoka H, Hamashima T, Michihara A. Brain Regions with Reduced Amounts of Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase Correspond to Sites of Strokes in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. 2020;3(3):106–12.
 57. De La Brousse FC, McKnight SL. Glimpses of allostery in the control of eukaryotic gene expression. *Trends Genet*. 1993;9(5):151–4.
 58. Morris JF, Hromas R, Rauscher FJ. Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol Cell Biol*. 1994;14(3):1786–95.
 59. Edelstein LC, Collins T. The SCAN domain family of zinc finger transcription factors. *Gene*. 2005;359:1–17.
 60. Mudduluru G, Vajkoczy P, Allgayer H. Myeloid zinc finger 1 induces migration, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol Cancer Res*. 2010;8(2):159–69.
 61. Moeenrezakhanlou A, Shephard L, Lam L, Reiner NE. Myeloid cell differentiation in response to calcitriol for expression CD11b and CD14 is regulated by myeloid zinc finger-1 protein downstream of phosphatidylinositol 3-kinase . *J Leukoc Biol*. 2008;84(2):519–28.
 62. Tsai LH, Wu JY, Cheng YW, Chen CY, Sheu GT, Wu TC, et al. The MZF1/c-MYC axis mediates lung adenocarcinoma progression caused by wild-type Ikb1 loss. *Oncogene*. 2015;34(13):1641–9.
 63. Vishwamitra D, Curry C V., Alkan S, Song YH, Gallick GE, Kaseb AO, et al. The transcription factors Ik-1 and MZF1 downregulate IGF-IR expression in NPM-ALK + T-cell lymphoma. *Mol Cancer*. 2015;14(1):1–17.

64. 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*. 2018;7(3):27. doi: 10.1038/s41389-018-0035-9.
65. 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-myb promoter activity. *Mol Cell Biol*. 1995;15(11):6075–87.

論文目録

本研究内容は、以下の論文に公表した。

1. Hiroshi Matsuoka, **Akiho Shima**, Arisa Uda, Hirotaka Ezaki and Akihiro Michihara. The retinoic acid receptor-related orphan receptor α positively regulates tight junction protein claudin domain-containing 1 mRNA expression in human brain endothelial cells. *Journal of Biochemistry*. 2017;161(5):441-450.
2. **Akiho Shima**, Hiroshi Matsuoka, Kaoruko Miya and Akihiro Michihara. Lovastatin suppresses the transcriptional regulation of CLDND1 in human hepatoma cells. *BPB Reports*. 2020;3(4):113-118.
3. **Akiho Shima**, Hiroshi Matsuoka, Alice Yamaoka and Akihiro Michihara. Transcription of CLDND1 in human brain endothelial cells is regulated by the myeloid zinc finger 1. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2020; doi: 10.1111/1440-1681.13416.
4. **Akiho Shima**, Takahiro Hamashima, Hiroshi Matsuoka, Alice Yamaoka, Yutaro Koga and Akihiro Michihara. 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*. 2020;3(6):190-195.

参考文献

共著論文は、以下に示す。

1. Hiroshi Matsuoka, **Akiho Shima**, Daisuke Kuramoto, Daisuke Kikumoto, Takashi Matsui and Akihiro Michihara. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, a Key Enzyme That Controls Blood Glucose, Is a Target of Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor α . *PLoS One*. 2015;10(9):1–11.
2. Akihiro Michihara, **Akiho Shima**, Hiroshi Matsuoka, Yurika Mizutani, Arisa Uda, Mayuko Mido, Asaki Oda, Hirotaka Ezaki and Yuka Uchino. Education activity on the prevention of disease using genetic analysis. *Jpn. J. Soc. Pharm.* 2017;36(1): 27-35.
3. Masatoshi Ohnishi, Hiroyuki Ochiai, Kohei Matsuoka, Marina Akagi, Yuta Nakayama, **Akiho Shima**, Arisa Uda, Hiroshi Matsuoka, Jun Kamishikiryo, Akihiro Michihara and Atsuko Inoue. Claudin domain containing 1 contributing to endothelial cell adhesion decreases in presence of cerebellar hemorrhage. *Journal of Neuroscience Research*. 2017;95(10):2051-2058.
4. Hiroshi Matsuoka, Aki Tamura, Masaki Kinehara, **Akiho Shima**, Arisa Uda, Hidetoshi Tahara and Akihiro Michihara. Levels of tight junction protein CLDN1 are regulated by microRNA-124 in the cerebellum of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;498(4):817-823.
5. Hiroshi Matsuoka, Riki Tokunaga, Miyu Katayama, Yuichiro Hosoda, Kaoruko Miya, Kento Sumi, Ami Ohishi, Jun Kamishikiryo, **Akiho Shima** and Akihiro Michihara. Retinoic acid receptor-related orphan receptor α reduces lipid droplets by upregulating neutral cholesterol ester hydrolase 1 in macrophages. *BMC Molecular and Cell Biology*. 2020;21(1):32. doi: 10.1186/s12860-020-00276-z.
6. Hiroshi Matsuoka, Miyu Katayama, Ami Ohishi, Jun Kamishikiryo, Kaoruko Miya, Riki Tokunaga, Sou Kobayashi, Yuya Nishimoto, Kazutake Hirooka, **Akiho Shima** and Akihiro Michihara. Orphan Nuclear Receptor ROR α Regulates Enzymatic Metabolism of Cerebral 24S-Hydroxycholesterol through CYP39A1 Intronic Response Element Activation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9):1-13.