

脳卒中易発症ラットの小脳における Cldnd1 タンパク質の 発現レベルはマイクロ RNA-124 により制御される

松岡浩史、田村安希、木根原匡希*、志摩亜季保、
宇田有沙、田原栄俊*、道原明宏

Biochem. Biophys. Res. Commun., **498**, 817-823 (2018)

Levels of tight junction protein Cldnd1 are regulated by microRNA-124 in the cerebellum of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat

Hiroshi Matsuoka, Aki Tamura, Masaki Kinehara, Akiho Shima,
Arisa Uda, Hidetoshi Tahara, and Akihiro Michihara

ABSTRACT The claudin family shows organ- and tissue-specific expression of individual members. Deficiency or aberrant expression of distinct claudins has been reported to be associated with severe pathophysiological consequences. Claudin domain-containing 1 (CLDND1), also known as claudin-25, shows homology to this family of proteins. Furthermore, serum CLDND1-derived peptide antibody levels are elevated in patients with cerebral infarction, as compared with healthy controls. We previously reported that, in the adult murine brain, CLDND1 is abundantly expressed in the cerebellum in common sites of intracerebral hemorrhage, and CLDND1 levels are transiently decreased after hemorrhagic insult. However, regulation of CLDND1 expression levels in cerebrovascular disease is poorly studied, and most regulatory microRNAs remain to be defined. We assessed its expression level, according to the presence of early signs of cerebrovascular disease, in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) and investigated the microRNA regulation of Cldnd1 mRNA. We investigated the post-transcriptional regulation of Cldnd1 by examining the subcellular distribution of its mRNA and evaluating its translational regulation by microRNA in human brain endothelial cells (HBECs) and in the brain of SHRSPs. Using bioinformatics, we identified a conserved microRNA-124 (miR-124)-binding site in the 3'-untranslated region of Cldnd1 and demonstrated that miR-124 regulates the translation of Cldnd1 mRNA reporters in a sequence-specific manner in luciferase assays. HBECs transfected with an miR-124 mimic showed decreased levels of CLDND1 mRNA in reverse transcription quantitative PCR. miR-124 levels were markedly lower in SHRSP than in Wister Kyoto rat brains, whereas Cldnd1 mRNA and protein levels were significantly higher. In SHRSP brains, Cldnd1 mRNA levels increased with a decrease in miR-124. Therefore, by interacting with Cldnd1 mRNA, miR-124 influences CLDND1 levels in the brain, thus playing a role in the development of cerebrovascular disease in SHRSPs.

抄録 クローディンファミリーのメンバーは、組織特異的な発現を示す。それらクローディンの異常な発現はいくつかの病態と関連することが報告されている。クローディンファミリーのメンバーである CLDND1 は、脳梗塞患者において血清中の抗体

レベルの増加が観察されている。また我々は、マウス小脳において *Cldnd1* の発現量が多いこと、その発現が脳出血時に低下することを報告してきた。CLDND1 において、その発現量と脳血管疾患との関連は明らかになりつつあるが、その調節機構については多くが不明である。本研究では、*in vitro* による脳血管培養細胞、および脳卒中易発症ラット (SHRSP) による病態モデルを用いて、CLDND1 の mRNA 発現に対するマイクロ RNA の調節機構について調査した。その結果、*in vitro* 実験系により CLDND1 の 3'-非翻訳領域に保存された miR-124 結合サイトに miR-124 が作用することで、CLDND1 発現が調節されていることが明らかとなった。さらに、SHRSP の小脳において、miR-124 の減少に従って、*Cldnd1* の mRNA 発現量の増加が観察された。以上の結果により、SHRSP の脳血管疾患の発症において、脳内における CLDND1 発現レベルに対して miR-124 の影響が関連付けられた。

* 広島大学大学院医歯薬保健学研究科

Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University