

# ヒト脳血管内皮細胞における CLDND1 転写は ミエロイドジンクフィンガー 1 により調節される

志摩亜季保、松岡浩史、山岡愛主、道原明宏

*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **48**(2), 260-269 (2021).

## Transcription of CLDND1 in human brain endothelial cells is regulated by the myeloid zinc finger 1

Akiho Shima, Hiroshi Matsuoka, Alice Yamaoka, and Akihiro Michihara

**ABSTRACT** Increased permeability of endothelial cells lining the blood vessels in the brain leads to vascular oedema and, potentially, to stroke. The tight junctions (TJs), primarily responsible for the regulation of vascular permeability, are multi-protein complexes comprising the claudin family of proteins and occludin. Several studies have reported that downregulation of the claudin domain containing 1 (CLDND1) gene enhances vascular permeability, which consequently increases the risk of stroke. However, the transcriptional regulation of CLDND1 has not been studied extensively. Therefore, this study aimed to identify the transcription factors (TFs) regulating CLDND1 expression. A luciferase reporter assay identified a silencer within the first intron of CLDND1, which was identified as a potential binding site of the myeloid zinc finger 1 (MZF1) through *in silico* and TFBIND software analyses, and confirmed through a reporter assay using the MZF1 expression vector and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. Moreover, the transient overexpression of MZF1 significantly increased the mRNA and protein expression levels of CLDND1, conversely, which were suppressed through the siRNA-mediated MZF1 knockdown. Furthermore, the permeability of FITC-dextran was observed to be increased on MZF1 knockdown as compared to that of the siGFP control. Our data revealed the underlying mechanism of the transcriptional regulation of CLDND1 by the MZF1. The findings suggest a potential role of MZF1 in TJ formation, which could be studied further and applied to prevent cerebral haemorrhage.

**抄録** 脳血管内皮細胞における物質透過性の亢進は、血管浮腫を引き起こし、脳卒中を惹起する。血管における物質透過性は、クローディンやオクルディンにより形成される密着結合により調節される。これまで我々は、脳出血誘発マウスにおいてクローディンファミリーに属する CLDND1 の発現低下により物質透過性が亢進することを報告している。これらのことから、脳卒中発症の原因である物質透過性の亢進は、CLDND1 の発現低下によっても誘発されると考えられる。しかし、CLDND1 の転写調節はあまり研究されていない。そこで、本研究では、CLDND1 発現に影響を及ぼす転写因子の同定を試みた。レポーター解析の結果、CLDND1 の第1イントロン内にサイレンサーが示された。サイレンサーに結合する転写因子を TFBIND 解

析で検索したところ、Myeloid Zinc Finger 1 (MZF1)が見出された。MZF1 発現ベクターを用いたレポーター解析およびクロマチン免疫沈降法により 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ことが示唆された。また、MZF1 一過性発現系において MZF1 発現増加に伴う CLDND1 の有意な発現増加が示された。siRNA を用いた MZF1 ノックダウンにおいて CLDND1 の有意な発現低下が示された。さらに、MZF1 ノックダウン細胞における FITC- デキストランの透過性は、コントロール群と比較して有意な増加が示された。これらの結果は、タイトジャンクション形成における MZF1 の潜在的な役割を示唆し、脳出血の予防に応用できる可能性がある。