

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：35409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20748

研究課題名（和文）コレステロールを介した細胞接着の転写調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Cholesterol-mediated transcriptional regulation of cell adhesion molecules

研究代表者

志摩 亜季保（SHIMA, Akiho）

福山大学・薬学部・助教

研究者番号：10910151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,500,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子ROR がCLDND1の転写に対し促進的に作用することを明らかにした。ROR のリガンドとしてコレステロール類が作用することから、コレステロール低下薬であるロバスタチンを用いてCLDND1の転写調節に対する影響を検討した。ロバスタチンによるコレステロールの低下は、CLDND1の発現調節に対し抑制的に作用していた。ロバスタチンは、コレステロール合成経路の上流を阻害するためコレステロール以外の中間代謝物であるメバロン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）およびファルネシルピロリン酸の影響を評価した。その結果、GGPPがCLDND1の転写に促進的に作用していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞接着分子CLDND1の発現低下は、血液脳関門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とが考えられる。脳卒中の危険因子の1つに脂質異常症が知られている。これまで、コレステロールやその中間代謝物を含むコレステロール類によるCLDND1の転写調節機構についての報告はなく、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、コレステロール合成経路の中間代謝物が及ぼすCLDND1の発現調節に対する影響を評価し、CLDND1の発現調節に対してゲラニルゲラニルピロリン酸の関与を明らかにした。この研究結果より、脳出血だけでなく脳卒中の予後を改善する治療への応用などに新しい展開をもたらすものと期待する。

研究成果の概要（英文）：Previous research has demonstrated that the transcription factor ROR promotes CLDND1 transcription. Cholesterols act as ligands for ROR ; therefore, we investigated the effect of lovastatin, a cholesterol-lowering drug, on the ROR -mediated transcriptional regulation of CLDND1. The lovastatin-induced cholesterol reduction exerted an inhibitory effect on CLDND1 expression. Lovastatin inhibits upstream steps in the cholesterol synthesis pathway; therefore, we also evaluated the effects of mevalonate, geranylgeranyl pyrophosphate, and farnesyl pyrophosphate, which are intermediate metabolites in cholesterol synthesis, on CLDND1 expression. We found that geranylgeranyl pyrophosphate promoted CLDND1 transcription.

研究分野：生化学

キーワード：コレステロール 細胞接着分子 クローディング 転写調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脳卒中は全世界の死因第2位を占めており、日本においても死因第4位である。また、寝たきりや認知症といった要介護状態になる原因疾患としても問題視されている。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、再発や後遺症には、長期的な治療や介護が必要である。そのため、超高齢化社会を迎えている日本において脳卒中の予後を改善する新規の薬物療法の開発が急務である。

脳血管における細胞間の物質透過性亢進は、血液脳関門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。これまでにモデル動物を用いた解析により、細胞接着分子 CLDN1 の発現減少が脳出血リスクを高めることを明らかにしてきた。CLDN1 の転写調節については、転写因子 ROR および MZF1 が関与していることを明らかにした。また、脳卒中の危険因子の1つに脂質異常症が知られている。これまで、コレステロール低下薬であるロバスタチンを用いてコレステロールを低下させると CLDN1 の発現が減少することを明らかにした。CLDN1 の発現調節に対してコレステロール以外の中間代謝物による影響も考えられるが、検討はされていない。

2. 研究の目的

血管内皮細胞における CLDN1 の発現低下が血液脳関門の破綻を通じて、脳卒中を誘発する細胞間の物質透過性を亢進させることを明らかにした。脳卒中発症の危険因子として脂質異常症が知られているが、細胞接着分子の発現調節に対するコレステロールの影響は不明である。CLDN1 の発現低下は、脳卒中の発症および悪化に関与していると考えられるが、それがどのような機序で生じているか明らかにされていない。本研究では、転写因子 ROR のリガンドとして最も効果のあるコレステロール中間代謝物を特定し、CLDN1 の発現量をコントロールすることで、脳卒中に対する効果的な治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定

ヒト肝細胞である HepG2 細胞を播種し、一晚培養後、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて -ガラクトシダーゼレポーターベクターを含むレポーターベクター (CLDN1 プロモーター) と ROR 発現ベクターまたはコントロールベクターの混合液をコ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 5 μ M メバロン酸、ファルネシルピロリン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸を添加後、さらに 40 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 をロバスタチンと同量添加し、前述と同様の時間培養した。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、GLOMAX20/20 Luminometer (Promega) により測定した。

(2) RNA の抽出および qRT-PCR

ヒト肝細胞である HepG2 細胞を播種し、一晚培養後、血清と抗生物質を含む新しい DMEM に交換した。20 μ M ロバスタチンのみ、20 μ M ロバスタチンを含む 5 μ M ゲラニルゲラニルピロリン酸

を添加後、さらに 48 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。培養した各種細胞は、ISOGEN 試薬 (Nippon Gene) を用いて total RNA を抽出した。total RNA の濃度と純度は Nano Drop One (Thermo Fisher Scientific) により算出した。cDNA は、PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa) を用いて合成した。qRT-PCR は、LightCycler 480 SYBR Green 1 Master (Roche) と 1 μ M プライマーを用いて反応させた。遺伝子発現の補正は、18S rRNA 遺伝子を内標準として用い、LightCycler ソフトウェア (Roche) により定量化した。

4 . 研究成果

(1) ROR 応答性へ影響を及ぼすコレステロール中間代謝物の選出

コレステロール合成経路の中間代謝物であるメパロン酸、ファルネシルピロリン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸による CLDND1 プロモーター領域に対する ROR 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と CLDND1 プロモーター領域を含むレポーターの応答性は、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、コレステロール中間代謝物の添加において有意な変化を示さなかった。それに対し、ROR 発現ベクターを用いた ROR 共発現においては、ロバスタチンにより低下した応答性が、ゲラニルゲラニルピロリン酸の添加により有意に増加した。ゲラニルゲラニルピロリン酸による応答性の回復は、ロバスタチン未処理細胞の応答性と同等であった。

(2) コレステロール類による CLDND1 発現への影響

CLDND1 発現レベルに対するゲラニルゲラニルピロリン酸の影響を明らかにするために mRNA レベルについて qRT-PCR により検討した。ロバスタチン処理細胞およびゲラニルゲラニルピロリン酸添加細胞における ROR 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、ロバスタチン処理細胞における CLDND1 mRNA レベルは有意な低下を示した。さらに、ゲラニルゲラニルピロリン酸添加細胞における CLDND1 mRNA レベルは、未処理細胞と比べて、有意な増加を示した。タンパク質レベルにおけるゲラニルゲラニルピロリン酸の影響については現在検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 志摩亜季保、松岡浩史、道原明宏	4. 巻 39
2. 論文標題 脳卒中に關与する細胞接着分子であるCLDND1の発現調節法の開発を目指して	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 福山大学薬学部研究年報	6. 最初と最後の頁 17-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山岡愛主、志摩亜季保、松岡浩史、濱島崇寛、小迫舞鈴、田原佑馬、道原明宏
2. 発表標題 ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子CLDND1の発現調節機構の解析
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------