

	おおたに けんと
氏名	大谷 健人
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	博士甲 第 号
学位授与の日付	2025年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目	ゾレドロン酸の脳梗塞への治療応用
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士 (薬学)) (副査) 教授 三澤 日出巳 (博士 (薬学)) 准教授 秋好 健志 (博士 (薬学))
慶應義塾大学学位規程第 11 条に基づく審査委員会実施日：	
2025 年 1 月 28 日	

論文内容の要旨

【背景】

脳梗塞は、本邦における脳卒中の約 8 割を占め、高齢化社会に伴って患者数が増加傾向にある。脳梗塞では、脳内の動脈が閉塞または狭窄することによって、脳血流が低下し、脳組織への酸素や栄養の補給が不足する結果、脳組織が虚血壊死（梗塞）に至る。虚血壊死した細胞から放出される内因性の炎症惹起因子は、**damaged-associated molecular patterns (DAMPs)**と呼ばれる。脳梗塞発症後に **DAMPs** として働く重要なタンパク質として **peroxiredoxin (PRX)** が近年の研究により同定されている。**PRX** は、脳内の免疫細胞であるミクログリアや脳梗塞発症後に血液脳関門の破綻に伴って脳梗塞巣に浸潤するマクロファージにおける **Toll-like receptor (TLR) 2** や **TLR 4** を活性化することで炎症を誘導する。脳梗塞発症後の脳内炎症は、脳組織の浮腫を引き起こし、脳梗塞患者の神経障害と機能予後を悪化させる。

脳梗塞発症後の炎症は、2—3 日の間続くが、脳梗塞発症後 4 日目以降は、次第に収束していく。このような炎症収束のメカニズムに中心的な受容体として、**macrophage scavenger receptor 1 (MSR1)** が近年の研究で明らかになった。ミクログリアやマクロファージにおける **MSR1** の発現は、脳梗塞発症 3 日目までに増強される。**MSR1** を高発現しているミクログリアやマクロファージによって、**DAMPs** が脳組織から除去されることは、脳梗塞発症後の炎症収束、神経変性阻止につながる。

現在までに、脳梗塞後の脳内炎症を標的とした治療薬の確立を目指した多くの臨床試験が失敗に終わっている。これは、これらの治療薬のほとんどが、免疫系に関連する炎

症因子やカスケードを標的とした免疫抑制剤や抗炎症薬であったことで、免疫細胞における炎症収束といった修復の過程におけるメカニズムも同時に抑制していたことによると考えられている。脳梗塞後の炎症を制御することで神経症状の悪化を防ぐ必要はあるが、炎症を抑制し続けると免疫細胞における修復過程をも阻害してしまう可能性が示唆されている。

そこで、本研究では MSR1 が有する炎症収束の機能に着目した。ミクログリアやマクロファージといった骨髄系細胞における MSR1 の発現量を増強することは、脳梗塞後の炎症収束を促進し、患者の機能予後を改善する治療薬を開発のための有望なアプローチとなると考えた。現在までに MSR1 の発現量を高効率に促進する治療薬は開発されていない。また、MSR1 の発現を制御している転写因子はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、骨髄系細胞において MSR1 の発現量を促進できる転写因子を明らかにすることで、脳梗塞への治療応用を目指した。

【方法】

中大脳動脈閉塞を用いた脳梗塞モデルマウス

麻酔下にある、C57BL/6J マウス (8-14 週齢) または *Lysm-Cre; Ets2^{flox/flox}* マウス (8-14 週齢) の総頸動脈からシリコンコーティングした 11 mm 長のモノフィラメントを挿入し、中大脳動脈を閉塞させて 60 分間虚血を誘導した後、フィラメントを抜いて脳血流を再開させた。

ATAC-seq

Percoll を用いた密度勾配遠心により分取した脳細胞を、抗 CD45 抗体と抗 CD11b 抗体で染色後、FACS Aria III を用いて CD45^{int}CD11b^{int} 細胞 (ミクログリア)、CD45^{hi}CD11b^{hi} 細胞 (マクロファージ) を単離した。DNA を抽出後、Tn5 による DNA の断片化と **tagmentation** を実施した。PCR による増幅後 Hiseq2500 による次世代シーケンサー解析を行った。解析結果は、マウスゲノムの mm9 にマッピングし、MACS を用いてピークコールを実施した。その後の motif 解析には、HOMER を用いた。

Single cell ATAC-seq

人工脳脊髄液を用いて分散した脳梗塞巣周囲の脳細胞を、FACS Aria III を用いて単離し、single cell ATAC-seq ライブラリーの作製を行った。DNBSEQ-G400 による次世代シーケンサー解析を行い、シーケンスリードは、Cell Ranger ATAC 2.1.0 を用いて mm10 にマッピングした。Single cell ATAC-seq のシグナル解析および細胞クラスタリングは、Signac 1.14.0 を用いた。

定量 PCR

脳内から単離したマクロファージや、レンチウイルスによって ETS family を過剰発現

させた RAW264.7 細胞、Zoledronic acid などの各薬剤を添加し 24 時間培養した骨髓由来マクロファージから total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。cDNA 合成後 SsoFast EvaGreen Supermixes、特異的プライマーを用いて CFX-Connect で定量 PCR を行った。CUT&Tag ライブラリーはリン酸化 ETS2 抗体と guinea pig anti-rabbit IgG 抗体を用いることで作成した。その後の定量 PCR は、*Msr1* 遺伝子のプロモーター領域に含まれる ETS2 結合配列のプライマーと ETS2 結合配列を含まない *Itgam* 遺伝子のプロモーター領域のプライマーを用いることで、DNA 断片の濃縮度を算出した。

Flow cytometry

DyLight™ 650 NHS Ester を用いてリコンビナント PRX タンパク質を蛍光標識し RAW264.7 細胞に添加した。添加後、30-60 分後に RAW264.7 細胞を回収し、蛍光強度を FACS Aria III によって測定した。MSR1 の発現量解析は、抗 MSR1 抗体で細胞を染色することで実施した。測定結果は、いずれも FlowJo で行った。

脳梗塞モデルマウスへの Zoledronic acid 投与

脳梗塞を作製した 24 時間後に、眼窩静脈叢から PBS に溶かした 200μg の Zoledronic acid を静脈内投与した。

神経損傷の評価

神経症状は、4 段階評価法 (0: 観察不能、1: 前肢屈曲、2: 丸めずに横押しに対する抵抗力低下、3: 丸めながらグレード 2 と同じ挙動) にしたがって盲検法で評価した。脳梗塞体積を計測するために、4% PFA/PBS で還流固定後、脳を取り出し、パラフィン切片を作製した。MAP2 抗体を用いて 1 次抗体染色を行った。HRP-conjugated anti-IgG antibody で 2 次抗体染色を行った後、DAB 染色を実施した。脳梗塞体積は、正常側半球面積 - (梗塞側半球面積 - 梗塞領域) で算出した。

【結果】

1. *Msr1* 遺伝子近傍におけるクロマチンの状態

まず、C57BL/6J マウスに中大脳動脈閉塞処置を行い脳梗塞を誘導した。脳梗塞発症 3 日後の脳組織から分取した CD45^{int}CD11b^{int} 細胞 (ミクログリア) と CD45^{hi}CD11b^{hi} 細胞 (マクロファージ)、偽手術 (sham) 処置マウスにおけるミクログリアにおいて、ATAC-seq を実施すると、複数の *Msr1* 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域を検出でき、特に脳梗塞後のミクログリアとマクロファージにおいて、プロモーター/エンハンサー領域に顕著な ATAC-seq のピークが検出された。ATAC-seq で得られたオープンクロマチン領域は、骨髓系細胞のみで観察されるか脳細胞網羅的に検証するために、single cell ATAC-seq を実施した。その結果、オープンクロマチン領域が脳梗塞巣周辺の脳細胞のうち骨髓系細胞で観察された。そこで、*Msr1* 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域の配列を用いて、Motif 解析を行うと、*Spi1*、*Spi.B*、*Elf5*、*Ets1* の ETS family に属する転写因子が *Msr1* 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域に結合する可能性が示唆された。

2. MSR1 の発現量を増強させて DAMPs の取り込みを促進する ETS family の同定

次に、ETS family 転写因子のうち実際に MSR1 の発現を増強できる転写因子をの同定を目指した。そこで、レンチウイルスを用いてマクロファージ様細胞株 (RAW264.7) に *Ets1*、*Ets2*、*Sp1*、*Etv1*、*Etv3*、*Etv5*、*Elk4* の様々な ETS family を過剰発現させて MSR1 の発現誘導能を qPCR により評価した。その結果、最も強く *Msr1* を発現誘導することができたのは *Ets2* を過剰発現させた RAW264.7 細胞であった。次に、蛍光標識した PRX を *Ets2* を過剰発現させた RAW264.7 細胞に添加し、flow cytometry によって Mean fluorescence intensity (MFI) を測定した。その結果、*Ets2* の過剰発現によって蛍光標識 PRX の RAW264.7 細胞内への取り込みが促進していた。以上のことから、骨髄系細胞における *Ets2* の発現を増強することで、MSR1 の発現を高め、DAMPs を排除促進することが明らかになった。続いて、*Msr1* 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域に ETS2 の結合配列が見出されたので、ETS2 が結合しているか CUT&Tag-定量 PCR を用いて検証した。その結果、*Msr1* 遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域への ETS2 の結合が確認できた。

3. *Msr1* の発現量を増強させる薬剤の探索

そこで *Ets2* を介して MSR1 の発現を誘導する薬を探索した。Comparative Toxicogenomics Database (CTD) は様々な遺伝子発現を制御する化合物のデータベースであるが、これを用いて *Ets2* の発現を誘導できる薬剤を探索したところ Zoledronic acid、Leflunomide、Ciprofibrate、Probucol、Clofibrate の 5 つの薬剤が候補として挙げられた。RAW264.7 細胞と比較し、生体内の細胞状態に近い条件で薬剤のスクリーニングを行うため、骨髄由来マクロファージにこれらの薬剤を添加し 24 時間培養した後に、qPCR を行った。その結果、Zoledronic acid のみが *Msr1* の発現を高めた。また、Zoledronic acid は濃度依存的に、骨髄由来マクロファージに *Ets2* の発現を誘導することも確認された。Zoledronic acid といった bisphosphonate は、c-jun N-terminal kinase (JNK) を活性化することが知られていたため、Zoledronic acid による *Ets2* の発現誘導に関与しているか検証した。その結果、Zoledronic acid によって増強していた *Ets2* の発現が JNK 阻害薬によって観察されなくなったことから、Zoledronic acid は JNK の活性化により *Ets2* の発現を増強していることが明らかになった。

4. Zoledronic acid による脳梗塞への治療効果の検証

最後に、脳梗塞に対する Zoledronic acid の薬効を評価した。脳梗塞を誘導し、24 時間後に 200 μ g の本薬剤を眼窩静脈内投与したところ、発症 3 日後の CD45^{hi}CD11b^{hi} 細胞における *Ets2* と *Msr1* の発現量が有意に上昇した。MSR1 の発現増強によって脳梗塞後の炎症収束が促進されることが期待できたので、Zoledronic acid によって脳梗塞後の炎

症が減弱するか検証した。その結果、脳組織中の Interleukin (IL)-1 β や Tumor necrosis factor (TNF)- α といった炎症性のサイトカインの発現が Zoledronic acid によって減少した。これは、MSR1 の発現増強により DMAPs の除去が促進された結果だと考えられる。さらに、Zoledronic acid の投与は、脳梗塞モデルマウスにおける運動麻痺を指標とした神経症状を有意に改善し、脳梗塞体積を縮小させた。以上のように、脳梗塞発症後 Zoledronic acid の投与は、脳梗塞後に脳組織へ浸潤した骨髄系細胞における *Ets2* と *Msr1* の発現を増強し、脳梗塞後の脳損傷を改善した。続いて、Zoledronic acid による脳梗塞への脳保護効果が骨髄系細胞における *Ets2* を介しているのか検証した。そのため、*Lysm-Cre; Ets2^{flox/flox}* マウスに脳梗塞を誘導し、ゾレドロン酸を投与したが、神経症状の改善と脳梗塞体積の縮小は観察されなかった。以上の結果から、Zoledronic acid による脳梗塞への脳保護効果は骨髄系細胞における *Ets2* を介していると考えられる。

【考察・結論】

本研究では、ATAC-seq を用いたエピジェネティックなスクリーニングを実施することにより、MSR1 の発現を増強する新規の転写因子として ETS2 を同定することができた。また、Zoledronic acid がマクロファージにおける *Ets2* や *Msr1* の発現を増強し、脳梗塞後の神経損傷を減弱させることは、本研究で初めて見出された。Zoledronic acid は、bisphosphonate の一つであり、多発性骨髄腫や固形癌骨転移による骨病変の改善や骨粗鬆症を改善する治療薬として US Food and Drug Administration (FDA) に承認されている。脳卒中患者では、非脳卒中患者と比較して、骨粗鬆症や骨折の発生頻度が高い。したがって、Zoledronic acid の投与は、脳梗塞後の神経損傷の抑制と、骨折の予防の両方によって、脳梗塞後の生活機能予後を改善するのに有用であると考えられる。

論文審査結果の要旨

本審査委員会では、申請者が約 25 分間の研究発表を行った後、約 45 分間の質疑応答を行った。最後に申請者が退出し、審査委員による協議を行った。

まず、本研究で使用した脳梗塞モデルマウスは、脳梗塞患者の病態などの観点からどのくらい近いのかという質問を受けた。申請者は、中大脳動脈を閉塞させる脳梗塞モデルは、脳梗塞患者における局所的な虚血状態を再現しているモデルであること、脳組織が壊死する範囲が非常に大きいことから、脳梗塞の種類のうち心原性脳梗塞を再現していると考えていること、また本モデルは、脳浮腫や血液脳関門の破綻を再現できている点がヒトの病態に近く、脳梗塞研究において非常に使用される頻度の高いモデルである旨を回答した。

続いて、審査委員より Raw cell への *Ets2* の強制発現で *Msr1* が 1.5 倍くらいしかないが、この程度で意味があるのか、*Ets2* は MSR1 を誘導する以外の他の作用を介して脳梗塞に効いているのではないかと、*Msr1* は機能的にどれくらい重要なのか、と質問を受けた。申請者は、RAW cell といったマクロファージにおける MSR1 の発現は元々高いことを説明したうえで、通常が発現量より 1.5 倍にできる *Ets2* は意味があり、実際に DAMPs の取り込み促進が観察できていると回答した。また、申請者は、本研究において、*Ets2* による他の作用を介していないことを直接検証はできていないが、少なくとも MSR1 を介しているのかどうかは、MSR1 欠損マウスを用いることで検証ができるとともに、MSR1 の重要性についても検証できると回答した。審査委員から、本研究を今後発表する際には、先行論文の知見をもとに、MSR1 の発現量を上昇させることで脳梗塞に対してどのように介入が可能となるのか、本研究の意義について具体的に説明するよう助言を受けた。

続いて、ETS2 が制御する遺伝子は *Msr1* 以外にいくつくらいあるのかという質問に、申請者は、具体的な数は回答できないが、ETS2 はマクロファージにおける IL-6 のプロモーター領域に結合することで炎症の制御を行っている報告が過去にあることを説明した。今回のゾレドロン酸による *Ets2* と *Msr1* の変化はヒトでも想定できるのか、という審査委員の指摘に対し、申請者は、本研究において ETS2 が結合していることを示した MSR1 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域の配列は、ヒトでも保存されている領域であることを UCSC genome Browser にて確認できていることから、同じようなメカニズムがヒトで生じる可能性はあると考えている旨を回答した。

続いて、ゾレドロン酸が炎症収束に寄与している根拠があるかという質問に対し、過去の報告において、脳梗塞発症後 1 日目に炎症応答がピークとなり、2,3 日目にかけて炎症が収束していくことが確認されていることを説明したうえで、本研究において脳梗塞発症 3 日目の脳組織において、ゾレドロン酸投与は炎症性サイトカインの発現量を減

小させる実験結果を得ていたことから、ゾレドロン酸投与による炎症反応の時間的経過を直接示せてはいないが、3日目のデータからゾレドロン酸は、炎症収束に寄与していると考えている旨を説明した。脳組織において、TNF- α のような炎症マーカーの測定はしなくてもいいのかという質問に対しては、mRNA レベルの発現量は確認しているが、タンパク質レベルの発現量の確認は、ELISA や免疫染色によって評価できると回答した。さらに、ゾレドロン酸の作用は局所で作用しているのか、それとも浸潤するマクロファージの性質を変えているのか、という質問に対して、申請者は、どちらの可能性もあると考えていると回答した。その上で、脳梗塞後には血液脳関門が破綻しておりゾレドロン酸は脳実質に届いていると考えられるので、脳梗塞発症後に脳内へ浸潤していたマクロファージに作用する場合と血中を流れていたマクロファージにゾレドロン酸が作用し、血中マクロファージが脳内に浸潤する二通りの可能性を補足説明した。

また、ゾレドロン酸による JNK の活性化とゾレドロン酸によるアウトプットはどう考えているのか、という質問に対して申請者は、JNK は SMAD3 を活性化することで炎症性のマクロファージ形成を抑制する報告があり、そのメカニズムの一つとして ETS2 の発現と MSR1 の発現誘導が関与している可能性があるとして述べた。また、MSR1 を高発現しているマクロファージは抗炎症性のマクロファージであることが知られているので、JNK は脳梗塞後の脳内に浸潤したマクロファージにおいては MSR1 の発現誘導することで、抗炎症性マクロファージ形成を促進していると考察している旨を説明した。薬剤学的に見てゾレドロン酸の濃度が高く、ヒトに展開するときに問題になるのではないかと質問に対して、申請者は、濃度が高いことに同意し、ヒトに展開する際には、最小有効濃度を検討し、その濃度が実際にヒトで利用できる濃度なのか、すでに骨粗鬆症の治療薬として使用されている観点から考慮する必要があると考えている旨を説明した。また、もしもその検討がうまく行かなければ、ゾレドロン酸を効率よく送達する脂質ナノ粒子などを開発することで解決する必要性を説明した。審査員からは、今回の投与量による血中濃度、脳組織への移行性や脳組織中での濃度を調べるのも重要だと助言を受けた。続いて、ゾレドロン酸の脳梗塞改善作用は、神経障害の症状を改善しているのか、回復を促進したのか、についての質問に申請者は、神経傷害の症状を改善していると回答したうえで、神経細胞は生きているが、虚血や炎症のストレスがかかっている領域であるペナンプラ領域をいかに残存させるかが脳梗塞の治療において重要であることを説明し、今回はゾレドロン酸によって炎症収束を早めたことで、炎症の広がりによってペナンプラ領域を失うことを防いだと考えられる旨を説明した。

公聴会では、現状の治療薬は治療時間枠が短いということだったが、ゾレドロン酸の投与時期について検討は行ったのか、という質問を受けた。申請者は、本研究では投与時期の検討は行っていないが、治療時間枠を長くすることを意図して、脳梗塞発症から 24 時間後にゾレドロン酸の投与を行った旨を述べ、発症から 48 時間後や 72 時間後の投与による検証は、脳梗塞患者への適応を広げるためにも重要な検討事項であると考えていると回答し

た。ゾレドロン酸がどのようにして *Ets2* の発現を誘導しているのかという質問に対し、申請者は、JNK の活性化を介している考えを述べた。その回答に対し、JNK ならば、内因性に炎症が起きて JNK が活性化されるはずであり、更に JNK の活性を上げるということで説明ができるのか、と質問を受けた。それに対し申請者は、本研究で用いた脳梗塞モデルマウスでは、炎症のピークが発症から 6 時間でありその後炎症は続くものの収束していくので、JNK の活性化も収束する可能性を述べたうえで、ゾレドロン酸は脳梗塞後の炎症による JNK の活性化が収束する時期に JNK の活性化を促すことで ETS2 の発現を誘導していると考えている旨を回答した。

また、ゾレドロン酸による破骨細胞への効果と骨髄系細胞への効果は一致しているのか、と質問を受けた。申請者は、破骨細胞はマクロファージの一種であるので同様のメカニズムが一部働いている考えを述べた。具体的に、ゾレドロン酸によるメバロン酸経路の FPPS を阻害する点は同じだと考えている。違いがあるとすと、コレステロール合成などが抑制されることで細胞死を起こすのは破骨細胞であるが、マクロファージの細胞数などは減少していないことを確認しているのでマクロファージにおいては細胞死が起こっておらず、コレステロール合成の抑制といった細胞内のストレスにより JNK が活性化したと推測している旨を回答した。ゾレドロン酸による効果が、ミクログリアとマクロファージで効果が違うのはなぜかという質問に対し申請者は、過去の報告で DMAPs の取り込み能が違う報告があることから、ミクログリアやマクロファージにおける貪食能の違いがゾレドロン酸の取り込みの違いを生み、その結果効果も違ったと考えている旨を述べた。

申請者の博士論文、学位審査委員会及び公聴会での発表、試問への回答は概ね妥当であった。MSR1 の発現量を増強できる新規の転写因子 ETS2 を同定し、ゾレドロン酸は MSR1 と ETS2 の発現量を増強することで脳梗塞に対する治療効果を示すことを発見した。このことから、本研究は学術的価値があるものと考えられ、博士（薬科学）を付与するに必要な能力を有すると判断した。

論文目録

主論文に関する原著論文

Kento Otani, Jun Tsuyama, Seiichiro Sakai, Koji Hase, and Takashi Shichita. Zoledronic acid attenuates ischemic brain injury by promoting ETS2 and MSR1 expression. *International Immunology* 2025, in press.