

博士学位論文 2024 年度

ゾレドロン酸の脳梗塞への治療応用

慶應義塾大学院薬学研究科

大谷 健人

## 目次

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| 略語                                                                | p.4  |
| 1. 序論                                                             | p.5  |
| 2. 実験方法                                                           | p.7  |
| 2.1 マウス                                                           |      |
| 2.2 脳梗塞モデルマウスの作製                                                  |      |
| 2.3 脳梗塞後の神経損傷の評価                                                  |      |
| 2.4 脳細胞の分取                                                        |      |
| 2.5 Single cell ATAC-seq 解析                                       |      |
| 2.6 ATAC-seq 解析とモチーフ解析                                            |      |
| 2.7 転写因子のクローニング                                                   |      |
| 2.8 レンチウイルスの作製                                                    |      |
| 2.9 転写因子を過剰発現させた細胞の発現解析                                           |      |
| 2.10 リコンビナントタンパク質の精製                                              |      |
| 2.11 DAMPs の細胞内取り込み能の評価                                           |      |
| 2.12 CUT&Tag 定量 PCR                                               |      |
| 2.13 初代骨髄由来マクロファージの培養                                             |      |
| 2.14 薬剤のスクリーニング                                                   |      |
| 2.15 定量 PCR                                                       |      |
| 2.16 Zoledronic acid 投与による脳保護効果の検証                                |      |
| 2.17 統計解析                                                         |      |
| 3. 結果                                                             | p.15 |
| 3.1 Msr1 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域には ETS の結合モチーフが濃縮している                   |      |
| 3.2 ETS2 は MSR1 の発現を増強し、DAMPs 排除を促進する                             |      |
| 3.3 Zoledronic acid は骨髄系細胞における <i>Ets2</i> と <i>Msr1</i> の発現を促進する |      |
| 3.4 Zoledronic acid は骨髄系細胞における <i>Ets2</i> を介して脳梗塞に対して脳保護効果を示す    |      |
| 4. 考察                                                             | p.18 |
| 5. 参考文献                                                           | p.20 |
| 6. 謝辞                                                             | p.23 |

|        |      |
|--------|------|
| 7. 図と表 | p.24 |
|--------|------|

## 略語

ACSF: artificial cerebrospinal fluid

ATAC-seq: assay for transposase-accessible chromatin using sequencing

CTD: Comparative Toxicogenomics Database

CUT&Tag: cleavage under targets and tagmentation

DAMPs: damage-associated molecular patterns

FDA: US Food and Drug Administration

IL: interleukin

IGF: insulin-like growth factor

JNK: c-jun N-terminal kinase

MSR1: macrophage scavenger receptor1

NMDG: N-methyl-D-glucamine

PBS: phosphate buffered saline

PFA: paraformaldehyde

PRXs: peroxiredoxin family proteins

TLR: toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor:

## 1. 序論

脳卒中は、高齢化社会に伴って、世界的に患者数が増加すると予想されており、寝たきりや死因の主な原因である<sup>1</sup>。脳卒中の中でも、本邦において約8割を占める脳梗塞では、脳組織を栄養する動脈が閉塞または高度狭窄することによって、脳血流が低下し、脳組織への酸素やグルコースの補給が不足する。その結果、脳組織が虚血壊死（梗塞）に陥ることで、脳内で炎症が生じる。脳梗塞後の脳内炎症によって脳浮腫が引き起こされると、残存する正常な脳組織が圧迫され、2次的な虚血が起こり、神経細胞死が促進される。脳梗塞後に神経細胞死が進むことによって、脳梗塞患者の日常生活動作は悪化する<sup>2</sup>。

このような、脳梗塞発症後の脳内炎症は、虚血壊死した細胞から放出される内在性の炎症惹起因子である **damaged-associated molecular patterns (DAMPs)**によって生じることが分かっている。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 family proteins (PRXs)**がこれまでに同定されている<sup>3</sup>。**PRX** は、脳梗塞発症後、12時間から24時間後に細胞外に放出されていることが観察されており、パターン認識受容体として知られる **Toll-like receptor (TLR) 2**や **TLR 4** を活性化し **Interleukin (IL)-1 $\beta$** や **Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$** などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。特に、脳梗塞後に血液脳関門が破綻することで脳組織に浸潤した免疫細胞であるマクロファージにおいて、**PRX** は **TLR 2**や **TLR 4** を活性化し、脳梗塞発症から2日から3日の間炎症を誘導する<sup>3</sup>。脳組織内に浸潤した骨髄系細胞のうち、マクロファージは、細胞膜上の **CD45** と **CD11b** を高発現している(**CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup>**) 細胞集団に多く含まれる骨髄系細胞の一種である。マクロファージの浸潤は、脳梗塞発症直後から始まり、**DAMPs** によって活性化されたマクロファージの放出する **IL-1 $\beta$** や **TNF- $\alpha$** は、神経細胞死を誘導する。その結果、梗塞巣が次第に拡大していく。

このような脳梗塞後の炎症は、発症後、数日経つと次第に収束していく。近年の研究において、**macrophage scavenger receptor 1 (MSR1)** は、**DAMPs** を細胞内に取り込んで排除し、脳内炎症を収束させる重要な受容体として同定された<sup>4</sup>。脳組織に浸潤したマクロファージにおける **MSR1** の発現量は、脳梗塞発症から3日目にかけて次第に上昇し、**PRX** などの **DAMPs** が脳組織から除去されることで、脳梗塞発症4日目から6日目にかけて炎症が収束する。このような **MSR1** による **DAMPs** の除去は、脳梗塞後の炎症による神経細胞死の拡大を防いでいると考えられる。脳梗塞を作製したラットにフタリド誘導体を投与すると、脳組織に浸潤したマクロファージにおける **MSR1** の発現を増加させて **DAMPs** の排除を促進し、**TNF- $\alpha$** の産生を減弱させることが報告されている<sup>5</sup>。したがって、脳梗塞後に脳組織に浸潤してきたマクロファージにおいて **MSR1** の発現量を促進することは、脳梗塞後の炎症収束を促進することで、神経傷害の程度を減弱させ、機能予後を改善させることが期待できる。**MSR1** を高発現しているマクロファージは、炎症性因子を産生せずに、脳梗塞後に神経保護的な作用を持つとされている神経栄

養因子である Insulin-like growth factor (IGF) 1 を高発現していることから、脳梗塞後の修復を担う細胞であると考えられている<sup>4</sup>。

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<sup>6</sup>。実際に、デキサメタゾンやステロイドといった免疫抑制剤は脳梗塞患者において脳浮腫への効果は観察されなかった<sup>7,8</sup>。また、IL-1 受容体拮抗薬を脳梗塞患者に投与しても治療効果を得ることができなかった<sup>9</sup>。これは、これらの治療薬のほとんどが、免疫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によると考えられている。これまで、脳に限らず各臓器における組織障害による炎症反応を抑制するだけでは、病態が改善されない場合もあることから、組織修復におけるメカニズムに炎症反応は、とても重要であると考えられてきた<sup>10</sup>。したがって、脳梗塞後の炎症は、神経細胞死を誘導し、梗塞巣を拡大することで機能予後を悪化させる要因であるため制御する必要があるが、抑制し続けると、MSR1 や IGF1 などが関与する免疫細胞における炎症の収束や修復機能をも抑制してしまう可能性が示唆される。

脳梗塞後の炎症に対し、抗炎症作用を目指した治療薬開発は脳梗塞患者の機能予後を改善する方法として有望とされてきた。それには、抗炎症作用を有する脂質、resolvins や neuroprotectin D1 などにこれまで注目が集まっていた。しかしながら、炎症収束を促進するような脳梗塞治療薬は、現在のところ十分な開発に至っていない。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。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。これまでに MSR1 の発現を促進させる分子はほとんど明らかになっていないため、本研究では、これを同定することにより脳梗塞後の脳機能回復を目的とした治療応用を目指した。

## 2. 実験方法

### 2.1 マウス

すべての動物実験は、東京都医学総合研究所の動物倫理委員会（許可番号:21-004）と東京科学大学の動物実験委員会（許可番号：A2023-172C2）承認の下で実施した。すべてのマウスは、明暗周期は 12/12 時間（照明点灯時間は 8:00-20:00）、温度 23 ± 1℃、湿度 50 ± 10%、自由飲水、自由摂食の環境下で飼育した。8-14 週齢の C57BL/6J マウスを日本クレア社より購入し実験に用いた。Lysm-Cre マウス (Jax No.004781) と *Ets2*<sup>flox/flox</sup> マウス (Jax No.020455) は Jackson Laboratory から購入し、交配した。

### 2.2 脳梗塞モデルマウスの作製

中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルマウスを用いた<sup>11</sup>。雄マウスを 70%の亜酸化窒素と 30%の酸素の混合ガス中で、イソフルラン (1~3 %吸入; Pfizer) を用いて麻酔下に、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 60 分間閉塞させて虚血を誘導した。側頭葉における脳血流量をレーザードップラー流量計によって測定し、中大脳動脈閉塞後に脳血流量が 70%以上減少したマウスを実験に用いた。脳虚血中は頭部温度を 36℃に保ち、中大脳動脈閉塞 60 分後に、モノフィラメントを除去して脳組織を再灌流させた。

### 2.3 脳梗塞後の神経損傷の評価

神経症状を、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)<sup>12,13</sup> にしたがって盲検法で評価した。

脳梗塞体積を評価するために、抗 MAP2 抗体による免疫組織染色を実施した。深麻酔下のマウスを十分量の生理食塩水で経心臓的に灌流したのち、4% paraformaldehyde (PFA) (Nacalai tesque)/ phosphate buffered saline (PBS) (Nacalai tesque) 25 ml で灌流固定を行った。頭蓋骨から脳を取り出し、4%PFA/PBS 中で 24 時間浸漬固定を実施した。その後、1 mm 厚の冠状切片を作製し、パラフィン包埋後に、5 μm のパラフィン切片を作製した。脱パラフィン後に、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸し、750 W のマイクロウェーブ照射により 15 分煮沸することで抗原賦活化を実施した。PBS で洗浄後、1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nacalai tesque)/methanol (Nacalai tesque) で内在性ペルオキシダーゼを除去した。PBS で洗浄後、Blocking One Histo (Nacalai tesque) で 1 時間ブロッキング処理した。PBS で洗浄後に、5% bovine serum albumin (BSA) (Nacalai tesque)/PBS で 1000 倍希釈した rabbit anti-mouse MAP2 antibody (Sigma-Aldrich) を用いて 1 次抗体染色を行った。PBS で洗浄後、5% BSA/PBS で 300 倍希釈した goat anti-rabbit IgG HRP polymer (Jackson Immune Research) で 2 次抗体染色を行った。PBS で洗浄後に、DAB キット (Nichirei

Biosciences) を用いて、発色させた後、脱水、透徹を行い、Paramount N (FALMA) を用いて封入した。脳梗塞体積は、ImageJ software 1.54f (National Institutes of Health) を用いることで、正常側半球面積 - (梗塞側半球面積 - 梗塞領域) の式で算出した。

## 2.4 脳細胞の分取

マウスを十分量の生理食塩水で経心臓的に還流した後、脳を取り出し、エッペンドルフチューブの中でミンスした。脳ホモジネートを 9 ml の RPMI-1640 (Nacalai tesque) で懸濁し、10 mg/ml の Collagenase type IV (Sigma) を 1 ml 加えた後、37°C で 30 分処理した。さらに 10 mg/ml の DNase I (Sigma) を 50  $\mu$ l 加えて 15 分処理し、2 ml の FBS を加えて酵素活性を失活させた。70%/37% の Percoll (GE Healthcare) 濃度勾配にかけ、中間層を採取することにより脳細胞を採取した。PBS で 400 倍希釈した anti-mouse CD45 FITC (eBioscience) と anti-mouse CD11b PercP-cy5.5 (eBioscience) を用いて、採取した脳細胞を抗体染色した後、数回 PBS で細胞を洗浄した。その後、FACS Aria III によって CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> の細胞集団を単離することで、ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) 解析を実施した。また、PBS で 400 倍希釈した Rat anti-mouse CD204 Alexa Fluor 647 (Bio Rad) で抗体染色し、MSR1 の発現量をフローサイトメトリーにて測定し、得られたデータを FlowJo 10.7.1 software (Tree Star) を用いて解析した。

## 2.5 Single cell ATAC-seq 解析

脳梗塞の光血栓虚血モデルマウスを作製するため、70%の亜酸化窒素と 30%の酸素の混合ガス中で、イソフルラン (1-3%吸入; Pfizer) を吸引させて麻酔下にマウスをステレオタキシスで固定し、頭皮を切開し頭蓋骨を露出させた。感光色素であるローズベンガル溶液 (Sigma-Aldrich) を体重 1 kg あたり 20 mg の容量で眼窩静脈叢内へ投与した。Primary motor cortex (M1) 領域に脳梗塞を作製するために、ブレグマから横方向 1.5 mm (左半球)、前方 0.2 mm の位置から 561 nm のレーザー (Coherent) を経頭蓋的に 5 分間照射した。その後、頭皮を縫合し 37°C のチャンバーでマウスを覚醒させた。

脳梗塞発症 7 日後における脳の全細胞の単離は、先行研究に基づいて実施した<sup>13</sup>。深麻酔下のマウスを十分量の N-methyl-D-glucamine (NMDG) 人工脳脊髄液 (NMDG-artificial cerebrospinal fluid; NMDG-ACSF) で経心臓的に灌流し、取り出した脳を氷冷した NMDG-ACSF に約 5 分間漬けておいた。取り出した脳を Liner slicer PRO 7N (DSK) を用いて 300  $\mu$ m の厚さにスライスした。スライスした脳を 34°C、NMDG-ACSF 内で 15 分間静置し、脳梗塞巣から約 2.0 mm 以内の脳皮質をトリミングした。脳皮質を 1 mg/ml Pronase (Sigma-Aldrich) /ACSF 溶液で 70 分間、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> (高圧ガス工業) でバブリングしながら酵素処理を行った。1% Fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich)/ACSF で脳組織を 3 回洗浄後、先端を炙って丸めたパスツールピペットを用いて脳組織を分散した。分散した細胞を ACSF で 1000 倍希釈した Anti-mouse Ty1.2 PE (Biolegend) と、ACSF で 400 倍希釈した Anti-mouse ACSA2 APC (Miltenyi Biotec)、Anti-



mouse CD31 PE-Cy7 (Biolegend)、Anti-mouse CD45 FITC (eBioscience)、Anti-mouse O4 APC (Miltenyi Biotec)、Anti-mouse CD140a APC (Biolegend)、Anti-mouse CD140b APC (Biolegend) を用いて抗体標識し FACS Aria III (BD Biosciences) で解析した SYTOX Green (Invitrogen) を添加し除去した上で、ACSA2、CD31、CD45、O4、CD140a、CD140b が陽性の細胞を単離するとともに、これらが陰性の細胞集団のうち神経細胞マーカーである Thy1.2 が陽性の細胞を神経細胞集団としてそれぞれ単離した。単離した細胞を混合したのちに、single cell ATAC-seq ライブラリーの作製を行った。Single cell ATAC-seq ライブラリーは、Chromium Next GEM Single Cell ATAC v2 Kit (10x Genomics) を用いてメーカーのプロトコルに従って調製し、DNBSEQ-G400 シーケンサー (MGI) でシーケンスを行った。シーケンスリードは、Cell Ranger ATAC 2.1.0 (10x Genomics) を用いてマウス参照ゲノム(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<sup>14</sup> を用いて実施した。各クラスターのアノテーションは、各脳細胞特異的マーカー遺伝子の ATAC-seq シグナル強度に基づいて実施した。

## 2.6 ATAC-seq 解析とモチーフ解析

脳から単離した CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> マクロファージ  $5 \times 10^4$  個に溶解バッファー (10mM Tris-HCl (Nacalai Tesque)、10mM NaCl (Nacalai Tesque)、3mM MgCl<sub>2</sub> (Nacalai Tesque)、0.1% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) の混合溶液を加えることで DNA を抽出し、transposase Tn5 (Illumina) 2  $\mu$ l を加えて 37°C で 1 時間処理した<sup>15</sup>。その後、PCR ([1 サイクル: 72°C 5 分、98°C 45 秒]、[15 サイクル: 98°C 15 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒]、[1 サイクル: 72°C 1 分]) で増幅後に HiSeq2500 による次世代シーケンサー解析を行った。マウスゲノムの mm9 にマッピングし、MACS<sup>16</sup> を用いてピークコールを行った。モチーフ解析は、*Msr1* 遺伝子の近傍におけるオープンクロマチン領域の配列を HOMER<sup>17</sup> によって解析した。

## 2.7 転写因子のクローニング

脳組織を採取し、RNAiso (Takara) を用いて RNA を抽出した。逆転写反応を PrimeScript RT reagent Kit (Takara) によって行い、cDNA を作製した。作製した cDNA を鋳型にして下記に記載したプライマーを使用し PCR を行うことで、転写因子を増幅した。

| Primer 配列                   | Sequence (5' to 3')                         |
|-----------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Spi.1</i> primer Forward | ATATCTCGAGGCCACCATGTTACAGGCGTGCAAATGGAAGG   |
| <i>Spi.1</i> primer Reverse | ATATAGAATTCTCAGTGGGGCGGGAGGC                |
| <i>Ets1</i> primer Forward  | ATATCTCGAGGCCACCATGAAGGCGGCCGTCGATCT        |
| <i>Ets1</i> primer Reverse  | ATAGCGGCCCGCTAGTCAGCATCCGGCTTTACATCCAG      |
| <i>Ets2</i> primer Forward  | TGTCTCGAGCGGCGCGATGAATGACTTTG               |
| <i>Ets2</i> primer Reverse  | TAAGAATTCTCAGTCTTCTGTATCAGGC                |
| <i>Etv1</i> primer Forward  | ATATCTCGAGGCCACCATGGATGGATTTTATGACCAGCAAGTG |

|                            |                                              |
|----------------------------|----------------------------------------------|
| <i>Etv1</i> primer Reverse | ATATAGAATTCTTAGTACACGTATCCTTCGTTGTAGGG       |
| <i>Etv3</i> primer Forward | ATATAGAATTCGCCACCATGAAAGCAGGCTGTAGCATCGTG    |
| <i>Etv3</i> primer Reverse | ATAGCGGCCGCTTAAGCATCAGCGGCAGCAGTG            |
| <i>Etv5</i> primer Forward | ATATCTCGAGGCCACCATGGATGGGTTTTGTGATCAGCAAGTCC |
| <i>Etv5</i> primer Reverse | ATAGCGGCCGCTTAGTAAGCGAAGCCTTCGGTGTAGGG       |
| <i>Elk4</i> primer Forward | ATATCTCGAGGCCACCATGGACAGTGCCATCACTCTGTGG     |
| <i>Elk4</i> primer Reverse | ATATAGAATTCTTATGTCTTCTGCAGGTCTGGAGAAAATGGG   |

PCR 後、アガロース電気泳動により PCR 産物が目的の大きさであることを確認した上で切り出した。FastGene Gel/PCR Extraction Ki (日本ジェネティクス) を使用しプロトコール通りに PCR 産物の精製を行った。PCR 産物とレンチウイルス作製用の plasmid Vector (pCSII) を制限酵素により処理した後、DNA Ligation Kit (Takara) を用いてプロトコールに従って Ligation 反応を行い、DH5 $\alpha$ コンピテントセルに形質転換することによってクローニングした。

## 2.8 レンチウイルスの作製

293T 細胞を 1 dish あたり  $1 \times 10^6$  個になるよう継代した。転写因子をクローニングした pCSII ベクターをトランスフェクションした。24 時間後、293T 細胞の培養上清を取り除き、1 M HEPES Buffer Solution (gibco) を 120  $\mu$ l ずつ添加した 10% FBS/RPMI-1640 で 2 日間培養した。293T 細胞の培養上清を回収し 1300 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 20 分遠心した後、0.45  $\mu$ m  $\Phi$  シリンジフィルター (Millex) を用いて濾過した後、8000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 24 時間遠心分離を行った。チューブ内の上清を取り除き、ウイルスペレットを 300  $\mu$ l の DMEM (Nacalai tesque) で懸濁し -80 $^{\circ}$ C で保管した。

## 2.9 転写因子を過剰発現させた細胞の発現解析

6 well dish に RAW264.7 を  $1 \times 10^5$  播種した 24 時間後に、150  $\mu$ l のレンチウイルス液を添加して 24 時間 37 $^{\circ}$ C で培養した。細胞を剥離して回収した後、PBS で 2 回洗浄した。その後、FACS Aria III で Venus 陽性細胞を検出することによりレンチウイルスに感染した細胞を単離した。 $1 \times 10^5$  個の sorting した細胞に対して Rat anti-mouse CD204 Alexa Fluor 647 抗体を PBS で 400 倍希釈して加え、4 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートした後に FACS Aria III で MSR1 の発現解析を行った。さらに定量 PCR で *Msr1* の発現を解析するために  $1 \times 10^5$  の RAW264.7 に対して、RNAiso によって RNA を抽出した。

## 2.10 リコンビナントタンパク質の精製

マウス *Prx1*、*Prx5*、*Prx6* 遺伝子の cDNA コンストラクトを pGEX6P-3 プラスミド (GE Healthcare) に挿入して BL21 (DE3) コンピテントセル (Gibco) に形質転換を行い、GST 融合タンパク質として発現させた。GST 融合タンパク質を glutathione-Sepharose 4B

columns (GEHealthcare) で精製した。タンパク質と結合した glutathione ビーズを 10 ml 程度の PBS で 6 回洗浄した上で、ビーズに PreScission Protease (GE Healthcare) を加え、4°C で 24 時間インキュベートすることで GST タグを除去した。組み換えタンパク質に Affi-Prep Polymyxin Media (Bio-Rad) 添加し、4°C で 4 時間インキュベートすることでエンドトキシンやエンドトキシンに結合したタンパク質を除去した。作製したリコンビナントタンパク質の濃度を BCA 法 (Nacalai tesque) によって測定し、実験に使用した。

## 2.11 DAMPs の細胞内取り込み能の評価

0.05 mg の DyLight<sup>TM</sup> 650 NHS Ester (Thermo scientific) を DMSO に溶かし、PRX1、PRX5、PRX6 リコンビナントタンパク質が各 50 µg 溶けている溶液に加え 60 分、室温、暗室下でインキュベートした。その後、未反応の NHS 基の除去のため 0.5 M Ethanolamine (Sigma Aldrich) を十分量加え 30 分、室温、暗室下でインキュベートした。さらに NAP-10 Colum (GE Healthcare) を用いてゲル濾過することによって、蛍光標識された PRX1、PRX5、PRX6 の混合液 (PRXs) を精製した。

実験前日より Raw264.7 を 6 well dish に  $1 \times 10^5$  個播種した。蛍光標識し PRXs を添加し、37°C で 30-60 分培養した。その後、培養上清を取り除き RPMI-1640 で 2 回細胞を洗浄した。そして、細胞を剥離し 1200×g 5 分で回収し、PBS で 2 回洗浄後に FACS Aria III で、蛍光標識したペプチドの細胞内取り込みを評価した。

## 2.12 CUT&Tag 定量 PCR

CUT&Tag ライブラリーは、Bench top CUT&Tag V.2 プロトコル (<https://www.protocols.io/view/bench-top-cut-amp-tag-kqdg34qdp125/v2>) の一部を改変するとともに、先行研究に基づいて実施した<sup>13</sup>。Ets2 を過剰発現している 20000 個の RAW264.7 細胞を室温、600×g 3 分で回収し、ペレット洗浄溶液 (20 mM HEPES (Nacalai tesque) pH 7.5, 150 mM NaCl (Nacalai tesque), 0.5 mM Spermidine (Sigma Aldrich), 1:100 Protease inhibitor cocktail (Nacalai tesque)) に懸濁した後、Concanavalin A コート磁気ビーズ (Bangs Labs) と室温で 10 分間インキュベートした。細胞を磁気スタンドで回収後、一次抗体 (抗リン酸化 ETS2 抗体 (Thermo Fisher) または、guinea pig anti-rabbit IgG 抗体 (antibodies-online.com), 1:50 希釈) を含む抗体溶液 (0.05% Digitonin (Millipore), 20 mM HEPES (Nacalai tesque) pH 7.5, 150 mM NaCl (Nacalai tesque), 0.5 mM Spermidine (Sigma Aldrich), 1:100 Protease inhibitor cocktail (Nacalai tesque), 2 mM EDTA (Nacalai tesque), 1% BSA (Nacalai tesque)) を加え、4°C で一晩インキュベートした。翌日、磁気スタンドを用いることで、一次抗体溶液を除去した後、二次抗体 (guinea pig anti-rabbit IgG 抗体 (antibodies-online.com), 1:100 希釈) を添加し、室温で 1 時間穏やかに振とうした。その後、磁気スタンドを用いることで 3 回の洗浄を行い、pA-Tn5 アダプター複合体 (1:200 希釈) を Dig-300 バッファー (0.025% Digitonin (Millipore), 20 mM HEPES (Nacalai tesque) pH 7.5, 300 mM NaCl (Nacalai tesque), 0.5 mM Spermidine (Sigma Aldrich), 1:100 Protease

inhibitor cocktail (Nacalai tesque))に調製し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、タグメンテーション溶液(10 mM MgCl<sub>2</sub> (Nacalai tesque) in Dig-325 Buffer) を加え、37°C で1時間インキュベートした。タグメンテーションの停止およびDNA断片の可溶化のために、0.5 M EDTA (Nacalai tesque): 2.25  $\mu$ L、10% SDS (Nacalai tesque): 2.75  $\mu$ L、20 mg/mL Proteinase K (Nacalai tesque): 0.5  $\mu$ L を添加し、55°Cで1時間インキュベートした。SPRI select ビーズ (Beckman Coulter) を用いてDNA精製を行い、0.1 $\times$ TEで溶出した。ライブラリー増幅は、NEBNext HiFi 2 $\times$  PCR Master Mix (New England BioLabs) と i5/i7 プライマー (各 10 mM, 1  $\mu$ L) を用いて行い、PCR 条件は以下の通り設定した: 72°C 5 分、98°C 30 秒; 98°C 10 秒、63°C 30 秒を 14 サイクル; 72°C 1 分の最終伸長、4°Cで保持。PCR 後の精製は SPRI select ビーズ (Beckman Coulter) を用いて行った。溶出 DNA をテンプレートとして、下記に示すプライマーで定量 PCR を実施した。

| ターゲット領域                       | Primer 配列 | Sequence (5' to 3')       |
|-------------------------------|-----------|---------------------------|
| <i>Msr1</i> 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域 | Forward   | CATAACCACATGGCTTTAAGTTTC  |
|                               | Reverse   | ACACGAATGAGATCTCATGTCAG   |
| <i>Itgam</i> 遺伝子のプロモーター領域     | Forward   | GGTAGAATTAGGCAGGGAGTTGAGC |
|                               | Reverse   | CAGAAGAACTGGTAAGACTGAGTTC |

*Msr1* 遺伝子のプロモーター領域に含まれる ETS2 結合配列を含む DNA 断片の濃縮度は、ETS2 結合配列を含まない *Itgam* 遺伝子のプロモーター領域を対照として正規化した。

### 2.13 初代骨髄由来マクロファージの培養

マウスを頸椎脱臼後に、大腿骨と脛骨を分取した。骨髄細胞を RPMI-1640 中に取り出し、細胞懸濁液を 40  $\mu$ m のセルストレーナー (FALCON) でろ過することで細胞塊を除去した。赤血球を除去するために、17 mM Tris/48 mM NH<sub>4</sub>Cl 溶液を加え、200 $\times$ g 5 分で回収した。骨髄由来マクロファージを培養するために、10% FBS/RPMI-1640 中に mouse macrophage colony-stimulating factor (Peprotech) を最終濃度 10 ng/ml になるよう添加した溶液を培養液とし、骨髄細胞を 37°Cで約 1 週間培養した。

### 2.14 薬剤のスクリーニング

化合物のデータベースである Comparative Toxicogenomics Database<sup>18</sup> より、過去に ETS2 の発現を誘導するとの報告がある化合物を検索して実験に使用した。各薬剤 (下記の表に示す) を骨髄由来マクロファージに添加した。ゾレドロン酸によって *Ets2* が誘導される分子メカニズムを検証するために、c-Jun N terminal kinase (JNK) の阻害剤である SP600125 (Wako) とゾレドロン酸を同時に骨髄由来マクロファージに添加した。薬

剤添加 24 時間後に RNAiso によって RNA を抽出した。

| 薬剤名             | メーカー   |
|-----------------|--------|
| Clofibrate      | Merck  |
| Ciprofibrate    | Cayman |
| Probucol        | Cayman |
| Leflunomide     | Cayman |
| Zoledronic acid | Cayman |

## 2.15 Zoledronic acid 投与による脳保護効果の検証

Zoledronic acid の投与効果を検証するために、脳虚血誘導 24 時間後に 2 mg/ml の Zoledronic acid を 1 匹あたり 100  $\mu$ l を眼窩静脈叢内に投与した。CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> の細胞集団における MSR1 の発現量解析は、Zoledronic acid の投与後 2 日目に FACS Aria III (BD) を用いて実施した。*Ets2* および *Msr1* の mRNA 発現レベルを解析するために、ゾレドロン酸を投与した脳梗塞マウスにおける虚血後 3 日目に、FACS AriaIII (BD) を用いることで CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞を単離し、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) によって RNA を精製した。炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルを解析するためにゾレドロン酸を投与した脳梗塞マウスにおける虚血後 3 日目の脳組織から RNAiso (Takara) を用いて RNA 抽出した。

## 2.16 定量 PCR

RNAiso によって RNA を抽出した後の逆転写反応は、PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara) または、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) によって行った。定量 PCR は、SsoFast Evagreen Supermixes (Bio-Rad) と CFX Connect (Bio-Rad) を用いることで行った。定量 PCR で使用した primer 配列を下記に示す。

| Primer 配列                  | Sequence (5' to 3')       |
|----------------------------|---------------------------|
| <i>Hprt</i> primer Forward | TGAAGAGCTACTGTAATGATCAGTC |
| <i>Hprt</i> primer Reverse | AGCAAGCTTGCAACCTTAACCA    |
| <i>Msr1</i> primer Forward | CTCATTGCTCTCTACCTCCTTG    |
| <i>Msr1</i> primer Reverse | AGTGAACAACTAAGCAGTTCTTC   |
| <i>Ets2</i> primer Forward | CATCCAAGAGAGGAGCGACC      |
| <i>Ets2</i> primer Reverse | GATTGGTCCGCTTCCAGTGA      |
| <i>Tnf</i> primer Forward  | CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA  |
| <i>Tnf</i> primer Reverse  | TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC   |
| <i>Il1b</i> primer Forward | CAGGCAGGCAGTATCACTCA      |

|                           |                     |
|---------------------------|---------------------|
| <i>Ilb</i> primer Reverse | AGGCCACAGGTATTTGTCG |
|---------------------------|---------------------|

## 2.17 統計解析

2 群間の比較において、全てのサンプルが正規分布しており、F 検定によって等分散性であったので、Student *t* 検定を使用した。3 群以上の比較においては、one-way ANOVA に続き、Dunnett's の方法による補正または、one-way ANOVA に続き、Tukey's の方法による補正を実施した。マウスの神経症状の経時的変化を観察する場合は、two-way ANOVA を行った。統計学的な有意差は\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  と表記した。

### 3.結果

#### 3.1 *Msr1* 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域には、ETS の結合モチーフが濃縮している

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 日後の脳組織より CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞を単離した (Fig.1a)。遺伝子網羅的にオープンクロマチン領域を解析するために、ATAC-seq を実施した結果、*Msr1* 遺伝子近傍に複数のオープンクロマチン領域を検出でき、特にプロモーター領域と Exon5 周辺に顕著な ATAC-seq のピークが検出された (Fig.1b)。ATAC-seq で検出されたオープンクロマチン領域は、骨髄系細胞のみで観察されるかどうか、脳細胞網羅的な解析を行うため脳梗塞巣周囲の脳組織から全ての脳細胞を単離し、single cell ATAC-seq を実施した。その結果、これらの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髄系細胞で主に観察された (Fig.1c,d)。オープンクロマチン領域の配列を用いてモチーフ解析を行った結果、*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 (Fig.1e)。以上の結果から、ETS family に属する転写因子は、骨髄系細胞における *Msr1* 遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

#### 3.2 ETS2 は MSR1 の発現を増強し、DAMPs 排除を促進する

ETS family に属する転写因子のうち実際に MSR1 を誘導できる転写因子を同定するため、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*、*Spi1*、*Etv1*、*Etv3*、*Etv5*、*Elk4* の様々な ETS family を過剰発現させて MSR1 の発現誘導能を評価した。RAW264.7 細胞を用いたスクリーニングにおいて、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 細胞であり、2 番目は *Ets1* を過剰発現させた RAW264.7 細胞であった (Fig.2a)。*Ets2* の過剰発現によって MSR1 の発現量が増強することを FACS を用いても確認された (Fig.2b)。脳梗塞における DAMPs の中でも主要な PRXs は RAW264.7 細胞の MSR1 を介して細胞内に取り込まれることが知られている<sup>4</sup>。本研究においても、*Ets2* の過剰発現によって蛍光標識 PRXs の RAW264.7 細胞内への取り込みが促進していた (Fig.2c)。以上の結果から、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 を排除促進できることが明らかになった。また、*Msr1* 遺伝子上流のエンハンサー/プロモーター領域におけるオープンクロマチン領域に 3 か所の ETS2 結合配列が見出された (Fig.2d)。ETS2 の 72 番目のスレオニンのリン酸化は、標的遺伝子のプロモーター領域を活性化することが報告されているので<sup>19,20,21</sup>、これらの ETS2 結合配列にリン酸化された ETS2 が結合していることを検証した。Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag) 定量 PCR を実施すると、コントロール抗体と比較し、リン酸化 ETS2 抗体 (Anti-pETS2) を用いることでこれらの ETS2 結合配列が濃縮される (Fig.2e)。以上の結果から、ETS2 が

*Msr1* 遺伝子上流のプロモーター/エンハンサー領域に結合することが明らかになった。

### 3.3 Zoledronic acid は骨髄系細胞における *Ets2* と *Msr1* の発現を促進する

そこで *Ets2* を介して MSR1 の発現を誘導する薬剤の脳保護効果を検証した。Comparative Toxicogenomics Database (CTD)<sup>18</sup> 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て培養した結果、Zoledronic acid のみが *Msr1* の発現を有意に高めた (Fig.3a)。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が確認できた (Fig.3b)。Zoledronic acid といった bisphosphonate は、c-jun N-terminal kinase (JNK) を活性化することが報告されていることから<sup>22,23</sup>、Zoledronic acid が JNK の活性化をすることで *Ets2* の発現を増強しているのかどうか検証を行った。骨髄由来マクロファージにおいて、Zoledronic acid と JNK 阻害薬 (SP600125) が同時に処理されることで、Zoledronic acid による *Ets2* の発現増強が観察されなくなった (Fig.3c)。これらの結果から、Zoledronic acid は、骨髄系細胞において JNK の活性化を介して、*Ets2* と *Msr1* の発現を促進していることが明らかになった。

### 3.4 Zoledronic acid は骨髄系細胞における *Ets2* を介して脳梗塞に対して脳保護効果を示す

最後に、脳梗塞に対する Zoledronic acid の薬効を評価した。C57BL/6J マウスに脳梗塞を誘導し、24 時間後に 200  $\mu$ g ゼレドロン酸を静脈内投与したところ、発症 3 日後の CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞における MSR1 の発現量が有意に上昇した (Fig.4a)。また、Zoledronic acid は、脳梗塞発症 3 日後に単離した CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞における *Ets2* と *Msr1* の発現を増強していた (Fig.4b)。CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞において MSR1 の発現が増強すると脳梗塞後の炎症は減弱するが<sup>4</sup>、実際に、Zoledronic acid を投与された脳梗塞マウスにおける TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  といった炎症性サイトカインの発現量が脳梗塞後の脳組織において減少していた (Fig.4c)。以上の結果から、脳梗塞発症 24 時間後の Zoledronic acid の投与は、CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞における *Ets2* と *Msr1* の発現を増強し、脳梗塞後の炎症を減弱させることが明らかになった。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た (Fig.4d)。脳梗塞発症 4 日後の脳梗塞体積は、Zoledronic acid 投与によって顕著に縮小した (Fig.4e)。以上のことから、脳梗塞発症後における 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 や MSR1 の発現を増強し、脳梗塞後の脳損傷を改善することが明らかになった。

Zoledronic acid による脳梗塞への脳保護効果が、CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞における *Ets2* の



発現誘導を介しているのかどうか検証するために、CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞特異的に *Ets2* を欠損した *Lysm-Cre; Ets2*<sup>flox/flox</sup> マウスに脳梗塞を誘導し、Zoledronic acid の脳保護効果を検証した。脳梗塞発症 24 時間後の *Lysm-Cre; Ets2*<sup>flox/flox</sup> マウスへの Zoledronic acid の投与は、神経症状を改善せず(**Fig.5a**)、脳梗塞体積は縮小しなかった (**Fig.5b**)。以上の結果から、Zoledronic acid は、CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞における *Ets2* を介して脳保護効果を示すことが明らかになった。

## 4. 考察

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 を同定し、Zoledronic acid を見出すことで脳梗塞への治療効果を示すことができた。MSR1 は、scavenger 受容体の一つであるが、現在までに、複数の化合物が scavenger 受容体の誘導物質として同定されている<sup>24,25</sup>。これらの化合物は、骨髄系細胞の抗炎症機能を促進することで、アルツハイマー病などの神経疾患に対する治療効果を発揮する。しかし、脳梗塞のように、急性に起こる神経傷害後の炎症収束を促進するような治療薬は十分に見出されていなかった。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を改善する治療薬としてすでに US Food and Drug Administration (FDA) に承認されている。Zoledronic acid は、破骨細胞形成と破骨細胞の骨吸収機能を阻害する<sup>26</sup>。Bisphosphonate は、骨中のマクロファージの一種である破骨細胞のアポトーシスを誘導することで骨粗鬆症を抑制できることがよく知られているが、本研究の *in vitro* や *in vivo* の実験においてマクロファージの細胞死は観察されなかった。Zoledronic acid がマクロファージにおける 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。これまで、Zoledronic acid のような Bisphosphonate は、食食能の高い骨髄系細胞に効率よく取り込まれることが知られているため<sup>27,28,29</sup>、脳梗塞発症後、食食能が活発になっている脳内に浸潤した骨髄系細胞において、*Ets2* や *Msr1* の発現が Zoledronic acid によって増強されることは、合理的であると考えられる。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<sup>30,31</sup>。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。

ETS2 は、炎症性サイトカイン産生に必要な細胞内シグナル伝達カスケードを抑制することが知られている転写因子である<sup>32,33</sup>。*Ets2* の発現上昇は、Bisphosphonate のひとつ Alendronate によって誘導される破骨細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている<sup>34</sup>。本研究において、ETS2 は骨髄系細胞において炎症惹起因子である DAMPs を効率よく排除する MSR1 の発現を増強することから、有望な治療標的であると考えられる。また、MSR1 の発現が高いマクロファージにおいて、炎症性のサイトカイン産生が起きない一方で、MSR1 の発現が低いマクロファージでは炎症性サイトカインを主に産生する<sup>4</sup>。MSR1 の発現が高いマクロファージは、DAMPs を脳組織から効率的に排除し、神経細胞に対し傷害を与える炎症を減弱させることから、Zoledronic acid によって CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞における *Ets2* や *Msr1* の発現が増強され、脳梗塞後の脳内炎症と神経細胞障害が抑制されたと考えられる。

Zoledronic acid を脳梗塞発症 24 時間後に投与することで、脳梗塞発症 3 日目における脳組織中の炎症性サイトカインの発現が減少していた。脳梗塞発症後の脳組織における炎症性サイトカインの発現量は、発症後 6 時間から 24 時間のうちに最大となり、3 日

目にかけて徐々に減少していく一方で、3日目にも炎症は残っていることが分かっている<sup>35,36</sup>。したがって、Zoledronic acid は、3日目に残存する炎症性サイトカインの発現を減弱させていると考えられ、Zoledronic acid によって脳梗塞後の炎症収束を促進させることができていることが示唆された。本研究において、脳梗塞発症 24 時間後における Zoledronic acid 投与は、2日目から神経症状の改善が始まることが明らかとなった。これは、3日目の時点で  $CD45^{hi}CD11b^{hi}$  細胞における MSR1 の発現が上昇していることから、Zoledronic acid 投与直後から MSR1 の発現が次第に上昇し始めたことで、DAMPs の除去が進み、神経細胞の機能が虚血によって機能不全に陥っているが細胞死には至っておらず治療によって細胞死を回避できるペナンプラ領域を残存させることができたことに起因すると考えられる。実際に、脳梗塞発症 4 日目の脳梗塞体積を評価した結果において、Zoledronic acid 投与によって脳梗塞体積が減少していることから、ペナンプラ領域における神経細胞が再び機能を取り戻すことによって神経症状が改善したと考えられる。

ATAC-seq は、生命現象における極めて重要な転写因子のエピジェネティックなスクリーニングに非常に有用なツールである。単一の転写因子を標的とする薬剤の開発が難しいが、化合物ライブラリーのスクリーニングやアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発はそのような薬剤を開発するための有効な戦略となる。実際、我々は、MSR1 の発現を増強する薬剤を発見するために、2000 種以上の化合物ライブラリーのスクリーニングも行った。しかしながら、見出された化合物は、生物学的半減期が非常に早かったことから、脳梗塞モデルマウスにおける治療効果を検証することが難しかった。本研究では、ATAC-seq を用いることで MSR1 の発現を増強する新規の転写因子である ETS2 を見出すことに成功した。その後、ETS2 の発現誘導剤をスクリーニングした結果、Zoledronic acid を見出すことができた。このように本研究は、エピジェネティックなスクリーニングが、免疫細胞を制御する治療薬開発のための標的転写因子の同定に有用であることを実証できたと考えられる。

## 5. 参考文献

1. Abbafati, C. *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)* **396**, 1204–1222 (2020).
2. H, M. *et al.* Cerebrospinal fluid influx drives acute ischemic tissue swelling. *Science* **367**, 1198–1199 (2020).
3. Shichita, T. *et al.* Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat. Med.* **18**, 911–917 (2012).
4. Shichita, T. *et al.* MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nat. Med.* **23**, 723–732 (2017).
5. Zou, X. *et al.* Neuroprotective Effect of Phthalide Derivative CD21 against Ischemic Brain Injury: Involvement of MSR1 Mediated DAMP peroxiredoxin1 Clearance and TLR4 Signaling Inhibition. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **16**, 306–317 (2021).
6. Stuckey, S. M., Ong, L. K., Collins-praino, L. E. & Turner, R. J. Neuroinflammation as a Key Driver of Secondary Neurodegeneration Following Stroke? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
7. Pongvarin, N. Steroids have no role in stroke therapy. *Stroke* **35**, 229–230 (2004).
8. Candelise, L., Colombo, A. & Spinnler, H. Therapy against brain swelling in stroke patients. A retrospective clinical study on 227 patients. *Stroke* **6**, 353–356 (1975).
9. Smith, C. J. *et al.* SCIL-STROKE (Subcutaneous Interleukin-1 Receptor Antagonist in Ischemic Stroke): A Randomized Controlled Phase 2 Trial. *Stroke* **49**, 1210–1216 (2018).
10. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
11. Morris, G. P. *et al.* A Comparative Study of Variables Influencing Ischemic Injury in the Longa and Koizumi Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *PLoS One* **11**, (2016).
12. Bederson, J. B. *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* **17**, 472–476 (1986).
13. Nakamura, A. *et al.* PLA2G2E-mediated lipid metabolism triggers brain-autonomous neural repair after ischemic stroke. *Neuron* **111**, 2995-3010.e9 (2023).
14. Stuart, T., Srivastava, A., Madad, S., Lareau, C. A. & Satija, R. Single-cell chromatin state analysis with Signac. *Nat. Methods* **18**, 1333–1341 (2021).
15. Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **109**, 21.29.1-21.29.9 (2015).
16. Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* **9**, (2008).
17. Heinz, S. *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime

- cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38**, 576–589 (2010).
18. Davis, A. P. *et al.* CTD tetramers: a new online tool that computationally links curated chemicals, genes, phenotypes, and diseases to inform molecular mechanisms for environmental health. *Toxicol. Sci.* **195**, 155–168 (2023).
  19. Baker, K. M., Wei, G., Schaffner, A. E. & Ostrowski, M. C. Ets-2 and components of mammalian SWI/SNF form a repressor complex that negatively regulates the BRCA1 promoter. *J. Biol. Chem.* **278**, 17876–17884 (2003).
  20. McCarthy, S. A. *et al.* Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2401–2412 (1997).
  21. Fowles, L. F. *et al.* Persistent activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 and ets-2 phosphorylation in response to colony-stimulating factor 1/c-fms signaling. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5148–5156 (1998).
  22. Moon, M. H. *et al.* Protective effect of hypoxia on bisphosphonate-related bone cell damage. *Mol. Med. Rep.* **3**, 869–875 (2010).
  23. Fu, L. *et al.* Stimulation of osteogenic differentiation and inhibition of adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells by alendronate via ERK and JNK activation. *Bone* **43**, 40–47 (2008).
  24. Yuan, C. *et al.* OAB-14, a bexarotene derivative, improves Alzheimer’s disease-related pathologies and cognitive impairments by increasing  $\beta$ -amyloid clearance in APP/PS1 mice. *Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis.* **1865**, 161–180 (2019).
  25. Dobri, A. M., Dudău, M., Enciu, A. M. & Hinescu, M. E. CD36 in Alzheimer’s Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Targeting. *Neuroscience* **453**, 301–311 (2021).
  26. Huang, X. L. *et al.* Zoledronic acid inhibits osteoclastogenesis and bone resorptive function by suppressing RANKL-mediated NF- $\kappa$ B and JNK and their downstream signalling pathways. *Mol. Med. Rep.* **25**, (2022).
  27. Hattori, Y. *et al.* Zoledronic acid enhances antitumor efficacy of liposomal doxorubicin. *Int. J. Oncol.* **47**, 211–219 (2015).
  28. Thompson, K., Rogers, M. J., Coxon, F. P. & Crockett, J. C. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol. Pharmacol.* **69**, 1624–1632 (2006).
  29. Rietkötter, E. *et al.* Zoledronic acid inhibits macrophage/microglia-assisted breast cancer cell invasion. *Oncotarget* **4**, 1449–1460 (2013).
  30. Kapral, M. K. *et al.* Risk of fractures after stroke: Results from the Ontario Stroke Registry. *Neurology* **88**, 57–64 (2017).

31. Li, J. Y., Shi, L. & Sun, J. M. The pathogenesis of post-stroke osteoporosis and the role oxidative stress plays in its development. *Front. Med.* **10**, (2023).
32. Quinn, S. R. *et al.* The role of Ets2 transcription factor in the induction of microRNA-155 (miR-155) by lipopolysaccharide and its targeting by interleukin-10. *J. Biol. Chem.* **289**, 4316–4325 (2014).
33. Ma, X. *et al.* Ets2 suppresses inflammatory cytokines through MAPK/NF- $\kappa$ B signaling and directly binds to the IL-6 promoter in macrophages. *Aging (Albany. NY)*. **11**, 10610–10625 (2019).
34. Zhang, Q. *et al.* Tumor necrosis factor prevents alendronate-induced osteoclast apoptosis in vivo by stimulating Bcl-xL expression through Ets-2. *Arthritis Rheum.* **52**, 2708–2718 (2005).
35. Nayak, A. R. *et al.* Time course of inflammatory cytokines in acute ischemic stroke patients and their relation to inter-alfa trypsin inhibitor heavy chain 4 and outcome. *Ann. Indian Acad. Neurol.* **15**, 181–185 (2012).
36. Berti, R. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 1068–1079 (2002).

## 6. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究全般から論文作成に至るまでご指導ご鞭撻賜りました長谷耕二教授、東京科学大学・神経炎症修復学分野・七田教授に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

研究に関する有益な御助言や実験手技を御指導して頂き、研究生活を支えてくださった東京科学大学・神経炎症修復学分野・津山淳研究員、酒井誠一郎研究員に心より御礼申し上げます。

実験手技の指導をしてくださった倉林久美子技官、過足芳子技官に深謝いたします。

本研究を行うにあたり書類や試薬発注の管理をしてくださった吉村真理子秘書に感謝申し上げます。

研究生活を共に過ごし、実験に関する相談に親身に乗ってくださいました、中村幸太郎さん、中村朱里さん、小山龍樹さん、中村彩夏さん、田中絵梨さんに感謝申し上げます。

研究の進捗報告の際に、研究に対する御助言をしてくださった生化学講座の皆まさに深く御礼申し上げます。

最後になりますが、27年間私を支えてくれて研究に没頭する機会を与えてくださった家族に深く感謝致します。

## 7. 図と表

Fig. 1

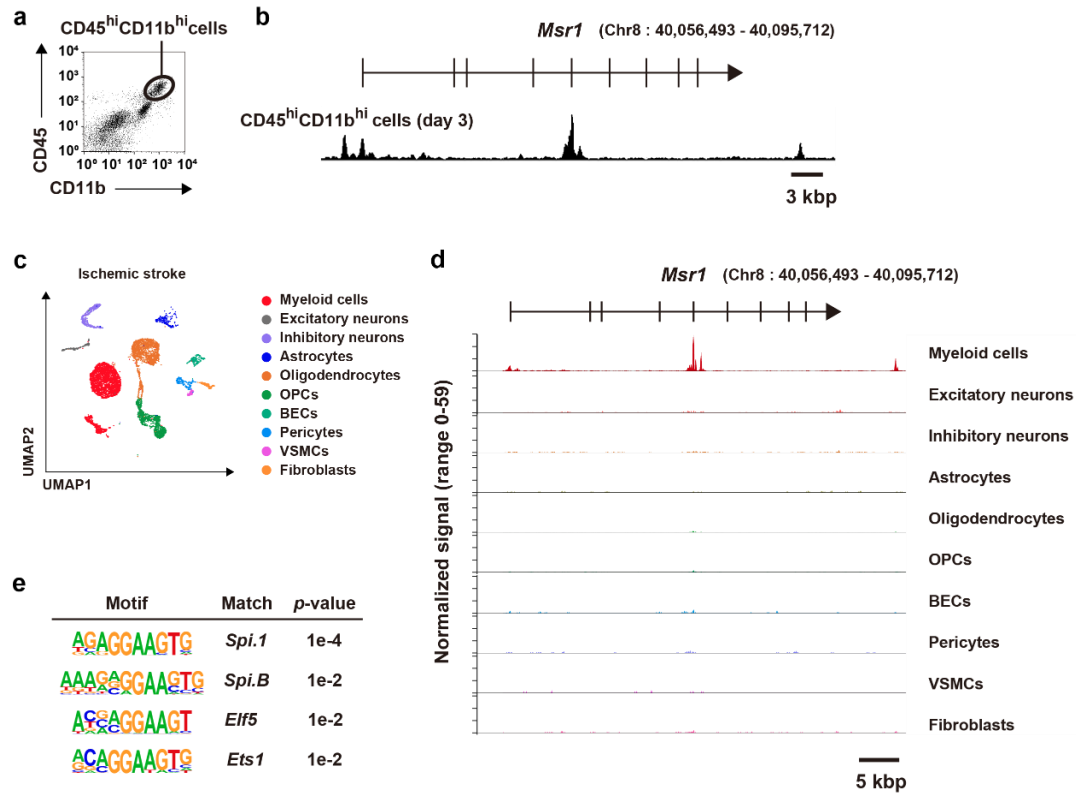
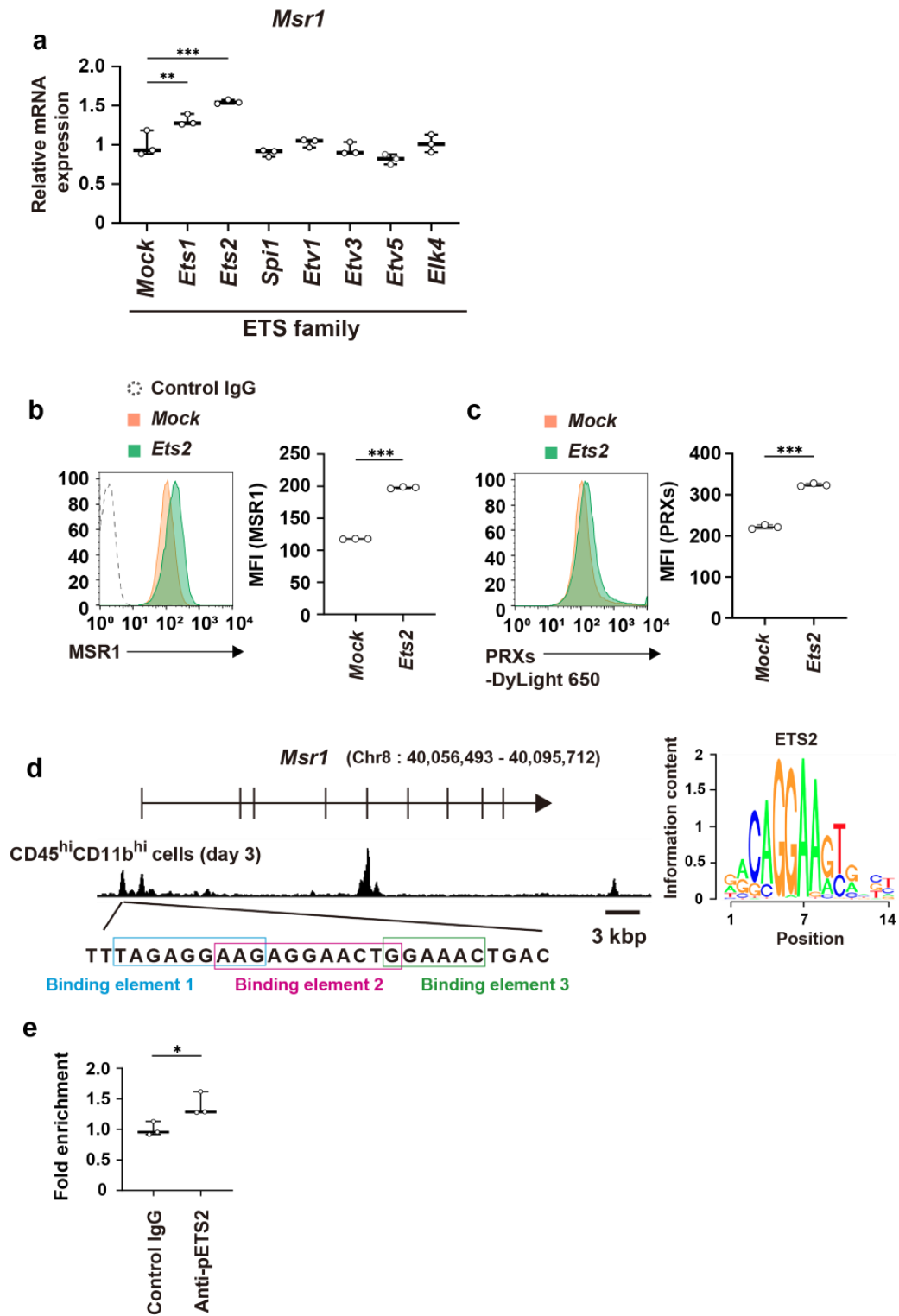


Fig. 1 脳梗塞後に脳組織へ浸潤した骨髄系細胞における*Msr1*遺伝子近傍のエピジェネティック解析

(a) 脳梗塞発症3日後の虚血脳組織を用いたFACSによる骨髄系細胞 (CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup>細胞) の単離。(b) CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup>細胞における*Msr1*遺伝子近傍のATAC-seq解析の結果。各ピークは、*Msr1*遺伝子近傍に存在するオープンクロマチン領域を示す。Bar: 3 kbp。(c) 一細胞ATAC-seq解析の結果。脳梗塞発症後7日目に脳梗塞巣周囲の脳組織から分取した脳細胞のUMAPを示す。オリゴデンドロサイト (OPCs: oligodendrocyte precursor cells)、脳内皮細胞 (BECs: brain endothelial cells)、平滑筋細胞 (VSMCs: vascular smooth muscle cells)。(d) 各脳細胞の*Msr1*遺伝子近傍におけるATAC-seqのシグナル強度。Bar: 5 kbp。(e) *Msr1*遺伝子近傍におけるオープンクロマチン領域の配列を用いたMotif解析の結果。



Fig. 2



**Fig. 2 ETS2は、MSR1の発現とDAMPsの取り込み能を骨髄系細胞において増強させた**

(a) ETS familyに属する転写因子を過剰発現させた RAW264.7 細胞における *Msr1* の mRNA 発現量。(b) *Mock* と *Ets2* を過剰発現させた RAW264.7 細胞における MSR1 の発現量。右図は MSR1 の発現量の比較 (MFI: mean fluorescence intensity)。(c) *Ets2* を過剰発現する RAW264.7 細胞を用いた、DyLight650 標識 PRX タンパク質の細胞内取り込み能。(d) オープンクロマチン領域 (*Msr1* 遺伝子の転写開始点より -2293 bp から -1870 bp) における ETS2 の転写因子結合配列 (右図) を 3 つ示す。(e) *Itgam* 遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域における ETS2 結合配列を持たない領域よりも、*Msr1* 遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域における、ETS2 結合配列 (-2106 bp から -2079 bp) を含む DNA 配列が濃縮していることを示す。*Ets2* を過剰発現する RAW264.7 細胞を用いた CUT&Tag-qPCR は、コントロール抗体 (Control IgG) と抗リン酸化 ETS2 抗体 (Anti-pETS2) が使用された。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. *Mock* を過剰発現する RAW264.7 細胞 (a,b,c)、コントロール抗体 (e) (one-way ANOVA with Dunnett's test [a], two-sided Student's t-test [b,c,e]) エラーバーは、平均  $\pm$  標準誤差を示す。

Fig. 3

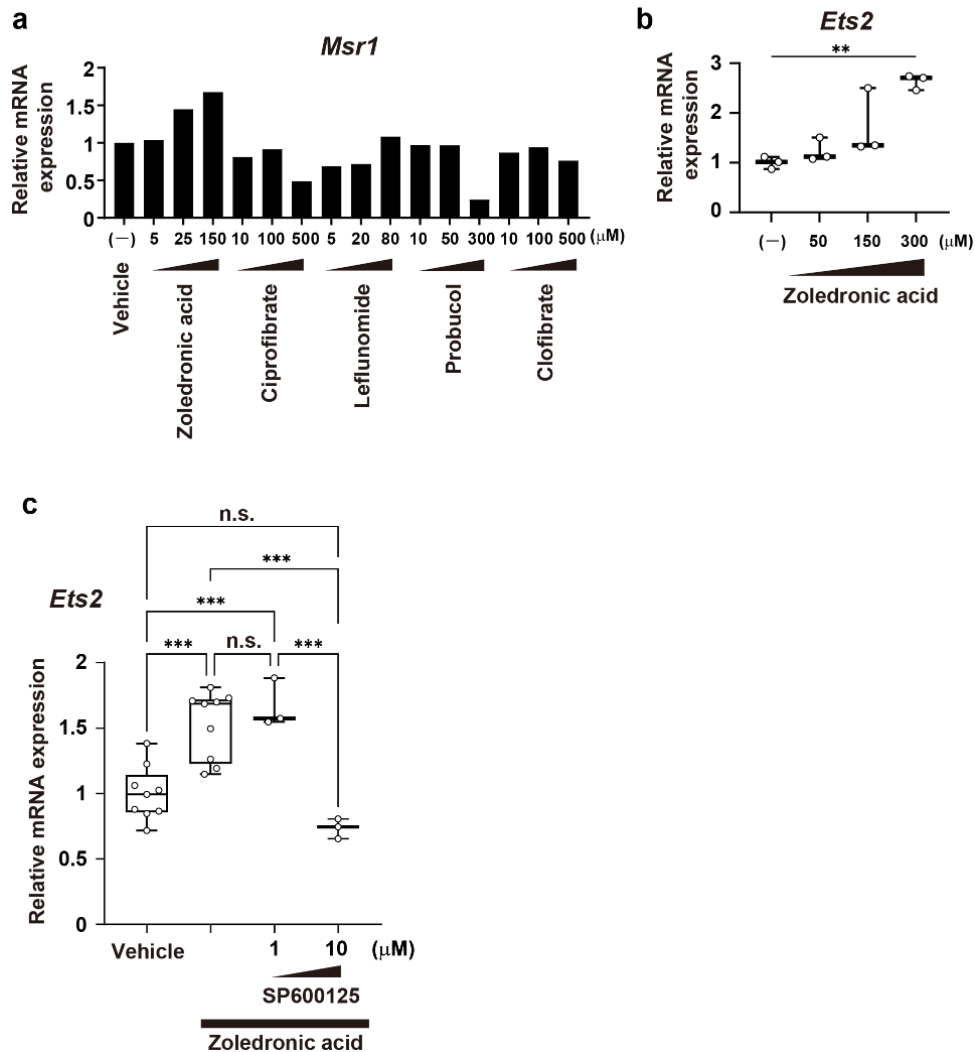
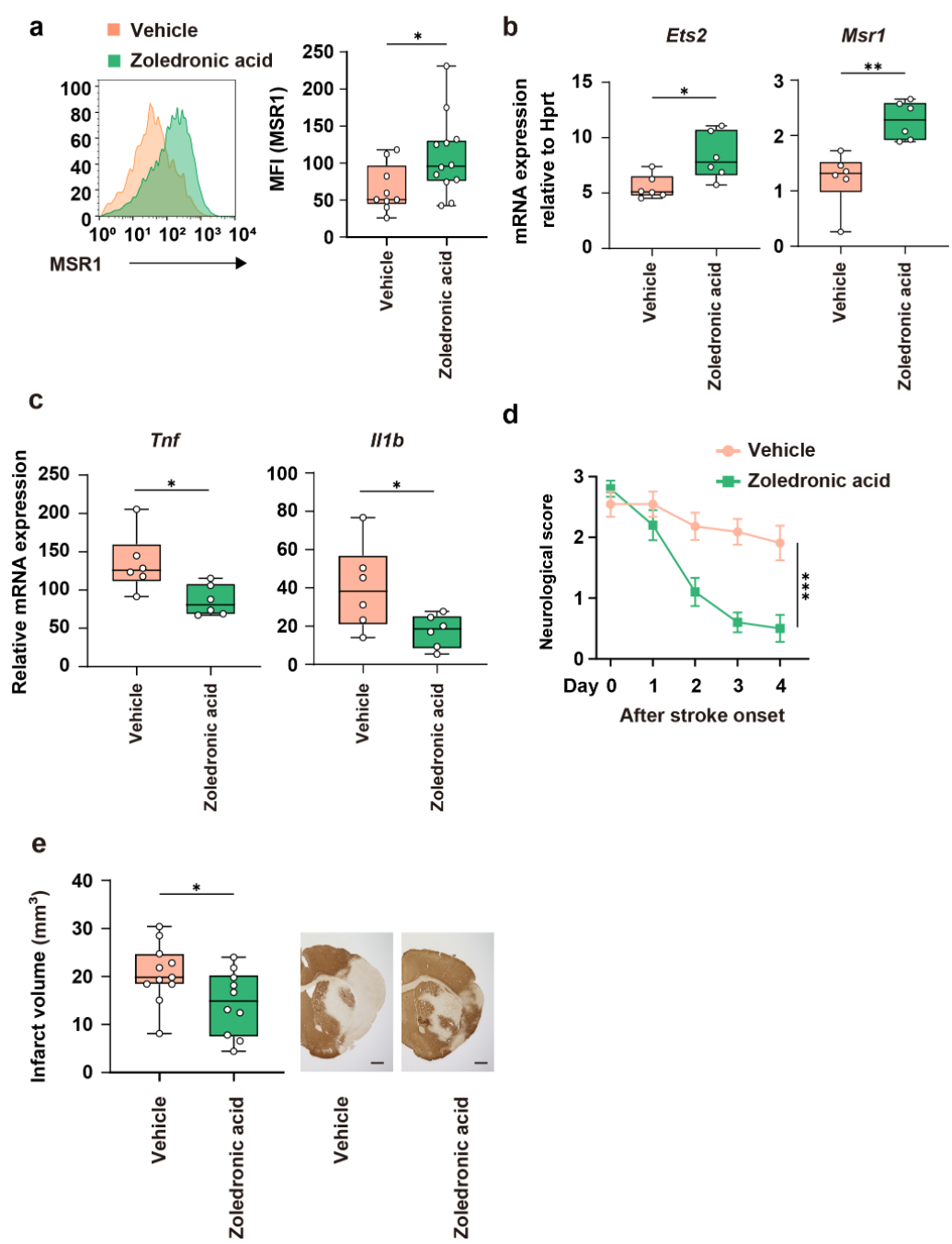


Fig. 3 Zoledronic acidは、骨髄系細胞における*Msr1*と*Ets2*の発現を増強した

(a) 各化合物を添加した24時間後の初代骨髄由来マクロファージにおける、*Msr1*のmRNA発現量の比較。(b) Zoledronic acidを添加した24時間後の初代骨髄由来マクロファージにおける、*Ets2*のmRNA発現量 (各濃度、n=3)。(c) Zoledronic acidと1 μMまたは10 μMでJNK阻害薬 (SP600125)を添加した24時間後の初代骨髄由来マクロファージにおける、*Ets2*のmRNA発現量。 \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. vehicleで処理した初代骨髄由来マクロファージ (b) (one-way ANOVA with Dunnett's test [b], one-way ANOVA with Tukey's test [c]) エラーバーは、平均 ± 標準誤差を示す。

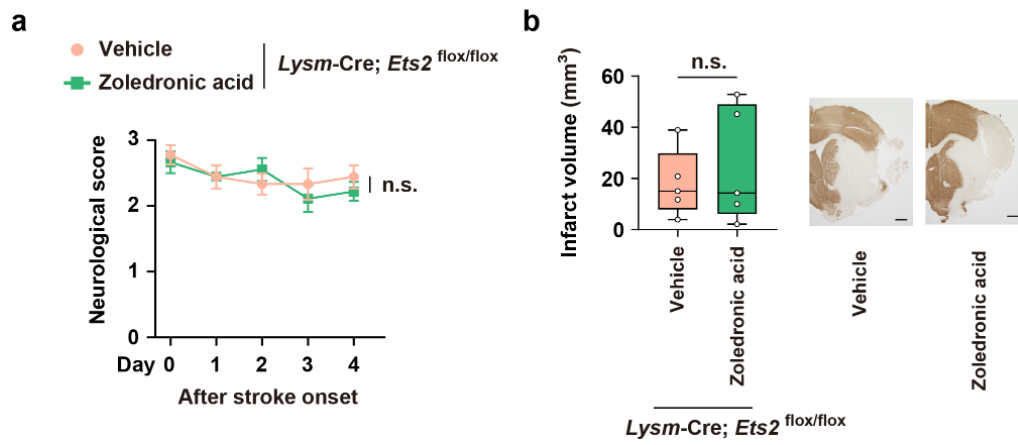
Fig. 4



**Fig. 4 Zoledronic acidは、脳梗塞に対する脳保護効果があった**

(a) 脳梗塞発症24時間後にVehicle (n=9) またはZoledronic acid (n=12) を投与し、脳梗塞発症3日後の脳内に浸潤した CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞におけるMSR1の発現量。(b) Vehicle (n=6) またはZoledronic acid (n=6) を投与し、脳梗塞発症3日後の脳内に浸潤した CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> 細胞における、*Ets2*と*Msr1*のmRNA発現量の比較。*Hprt*との相対値を示す。(c) Vehicle (n=6) またはZoledronic acid (n=6) を投与し、脳梗塞発症3日後の脳組織における、炎症性サイトカインのmRNA発現量のそれぞれVehicle またはZoledronic acid を投与した偽手術マウスとの相対比較。(d) 脳梗塞発症24時間後にVehicle (n=11) またはZoledronic acid (n=10) を投与したマウスにおける脳梗塞後の神経症状の経時変化。(e) 脳梗塞発症24時間後にVehicle (n=11) またはZoledronic acid (n=10) を投与したマウスにおける脳梗塞発症4日後の脳梗塞体積。Bar: 500μm。\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs. Vehicle を投与したマウス (a,b,c,d,e) (two-sided Student's t-test [a,b,c,e], two-way ANOVA [d]) エラーバーは、平均 ± 標準誤差を示す。

Fig. 5



**Fig. 5 Zoledronic acidは、骨髓系細胞における*Ets2*を介して脳梗塞に対する脳保護効果を発揮した**  
 (a) 脳梗塞発症24時間後にVehicle (n=9) またはZoledronic acid (n=9) を投与した*Lysm-Cre; Ets2<sup>flox/flox</sup>*マウスにおける脳梗塞後の神経症状の経時変化。(b) 脳梗塞発症24時間後にVehicle (n=5) またはZoledronic acid (n=5) を投与した*Lysm-Cre; Ets2<sup>flox/flox</sup>*マウスにおける脳梗塞発症4日後の脳梗塞体積。Bar: 500μm. n.s.: not significant vs. Vehicle を投与した*Lysm-Cre; Ets2<sup>flox/flox</sup>*マウス (two-way ANOVA [a], two-sided Student's t-test [b]) エラーバーは、平均 ± 標準誤差を示す。