

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	大谷健人
主 論 文 題 名： ゾレドロン酸の脳梗塞への治療応用				
(内容の要旨) 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）に至り脳内で炎症が生じる。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。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によると考えられる。臓器損傷後の組織の炎症は、損傷後の回復過程や組織の修復過程に必要であると考えられていることから、炎症を抑制するのではなく、炎症の収束と組織の修復を促進することが、患者の機能予後を改善する治療薬を開発するための有望なアプローチであると考えた。 近年の研究において、macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) は、脳梗塞後の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) を脳内から排除する重要な受容体として同定された。脳梗塞において DAMPs として機能する分子として、peroxiredoxin (PRX) などのタンパク質が知られており、脳梗塞後に脳内へ浸潤した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脳梗塞発症から 2—3 日の間炎症を誘導する。しかしながら、脳梗塞発症から 4 日から 6 日目にかけて脳内に浸潤したマクロファージにおける MSR1 の発現量が上昇することで、DAMPs が脳組織から除去され炎症が収束していく。したがって、脳梗塞発症後に、浸潤性のマクロファージにおける MSR1 の発現量を増強することができれば、脳梗塞後の炎症収束を促進し、結果的に神経障害を減弱させ機能予後を改善できると考えられた。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。そこで、本研究では、浸潤性のマクロファージにおいて MSR1 の発現量を促進できる因子を同定することで、脳梗塞への治療応用を目指した。私はこれまで、MSR1 を誘導できる薬剤を探索するため、2000 種類以上の化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、いくつかの候補化合物を見出すことができたものの、生体内				

での代謝が早く脳梗塞への治療応用はできなかった。

そこで、これまでほとんど明らかになっていない **MSR1** の発現を制御する転写因子を同定することで、より高効率に **MSR1** を誘導できる治療応用を目指すアプローチに変更し、**ATAC-seq** 解析を実施した。**ATAC-seq** は、遺伝子発現の制御に関わるクロマチンの状態を遺伝子網羅的に解析できる技術であり、**MSR1** の発現を増強できる転写因子の探索に最適であると考えた。そこで私は、脳梗塞モデルマウスの脳内から **CD45^{hi}CD11b^{hi}** の骨髄系細胞を分取し、**ATAC-seq** 解析を実施することで、**Msr1** 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域を解析した。その結果、**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た。続いて、**Msr1** 遺伝子近傍の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、脳の全細胞を用いた **single cell ATAC-seq** 解析を実施した。その結果、これらのオープンクロマチン領域は主に骨髄系細胞で観察されることが分かった。**Msr1** 遺伝子近傍のプロモーター領域で観察されたいくつかのオープンクロマチン領域の配列を用いて、オープンクロマチン領域に結合する転写因子を探索した。その結果、転写因子 **SPI1** や **ETS1** などの **ETS family** が **Msr1** 遺伝子近傍のオープンクロマチン領域に結合することが示唆された。

次に、**ETS family** のうち、どの転写因子が **MSR1** の発現量を増強できるか検証するために **ETS family** に属する様々な転写因子をマクロファージ様細胞株である **RAW264.7** 細胞に過剰発現させ、**MSR1** の誘導活性能を解析した。その結果、**ETS2** を過剰発現させた際に **MSR1** の発現量が有意に増加した。そのため、**ETS2** が最も高い **MSR1** 誘導活性能を持つことが判明した。また、**ETS2** を過剰発現させると、**DAMPs** の一つである **PRX** の取り込み能が **RAW264.7** 細胞において有意に増加した。**ETS2** の転写因子結合配列が **Msr1** 遺伝子近傍のプロモーター/エンハンサー領域に見出されたため、実際にこの領域へ **ETS2** が結合するかどうかは、**Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag)** 定量 **PCR** を実施することで確認できた。以上の結果から、**ETS2** は、**MSR1** の発現を増強し **DAMPs** 排除を促進できる脳梗塞への治療応用を目指した標的因子として有望であると考えられた。

そこで、**ETS2** を誘導できる薬剤を探索するために、化合物のデータベースを用いて **ETS2** の発現を誘導する可能性のある薬剤を複数取得した。取得された化合物が **Msr1** を誘導できるかどうか検証するために、化合物を様々な濃度で骨髄由来のマクロファージに添加した。その結果、**Zoledronic acid** が **Msr1** の発現量を濃度依存的に増強できる化合物であることを見出した。また、**Zoledronic acid** は **Ets2** の発現量を濃度依存的に増強できることを確認した。**Zoledronic acid** は、脳梗塞発症後、浸潤性マクロファージにおいて **MSR1** や **ETS2** の発現を増強することで、脳梗塞後の治療薬として応用できるのでは

ないかと考えられた。

Zoledronic acid の脳梗塞への治療効果を検証するために、脳梗塞モデルマウスに Zoledronic acid を静脈内投与した。その結果、CD45^{hi}CD11b^{hi} 細胞において、*Ets2* と *Msr1* の発現量が有意に上昇した。*MSR1* の発現が骨髄系細胞において増強すると脳梗塞後の炎症は、減弱することが報告されていた。そこで、Zoledronic acid を投与した脳梗塞モデルマウスにおける脳組織中の炎症性サイトカインの発現量を検証すると、Zoledronic acid によって Interleukin (IL)-1 β や Tumor necrosis factor (TNF)- α の発現量がコントロール群と比較して減少していた。さらに、Zoledronic acid 投与によって神経症状の改善と脳梗塞体積の有意な減少が見られた。したがって、Zoledronic acid は浸潤性の骨髄系細胞における ETS2 と MSR1 の発現を増強し、脳組織中の炎症を減弱させることで脳梗塞に対する脳保護効果を持つことが見出された。

最後に、Zoledronic acid の脳梗塞への脳保護効果は、骨髄系細胞における *Ets2* を介しているのかどうか検証した。*Lysm-Cre; Ets2*^{flox/flox} マウスは、骨髄系細胞特異的に *Ets2* を欠損しているマウスだが、*Lysm-Cre; Ets2*^{flox/flox} マウスに脳梗塞を誘導すると、Zoledronic acid による神経症状の改善と脳梗塞体積の減少が観察されなかった。以上の結果から、Zoledronic acid の脳梗塞への脳保護効果は、骨髄系細胞における *Ets2* を介していることが明らかになった。

Zoledronic acid は、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、また骨粗鬆症の治療薬としてすでに US Food and Drug Administration (FDA) に承認されており、本研究における結果は、Zoledronic acid の脳梗塞治療に対するドラッグリポジショニングの可能性を示したと考えられる。

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、これまで発見されていなかった MSR1 の発現を増強する新規の転写因子として ETS2 を同定することに成功した。その後、ETS2 をの発現を誘導する化合物を探索した結果、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系を制御する治療薬の開発に有用であることを示せたと言える。