

バレニクリンによる $\alpha 7$ ニコチン受容体を介した 中枢性有害毒性

バレニクリン有害作用対策チーム（課題番号：137107）

研究期間：平成 25 年 7 月 24 日～平成 28 年 3 月 31 日

研究代表者：古賀久

研究員：町田 崇（平成 27 年 3 月 31 日まで）、道具伸也（平成 27 年 4 月 1 日から）

【研究成果】

＜背景および目的＞

喫煙は、虚血性心疾患、脳血管障害、慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの疾患（喫煙リスク疾患）を発症・増悪させる危険因子である。これらの疾患において積極的な禁煙治療が推奨されており、医療重点課題として取り組まれている。これに伴い、経口禁煙補助薬バレニクリンの使用が著しく増加している（国内使用者約85万人/最近3年間）。バレニクリンは、 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）部分作動薬、 $\alpha 7$ nAChR 完全作動薬である。禁煙成功率がニコチン代替療法よりも高く、喫煙しながらの服用が可能（服用開始1週間）、禁煙に対するストレスも軽減される。このようにバレニクリンは画期的で有用性も高い薬である。

しかし、バレニクリンは、意識障害、自殺、自殺念慮、振戦など重篤なものから悪夢、興奮、抑うつ、不安などの中等度に至る多様な中枢性有害作用を発現する。このため治療の中断を余儀なくされることも多い。実際、本国では意識障害に伴う自動車事故が発生し「安全性情報」により注意が喚起された。また、米国では自殺・自殺念慮を示す患者数が他の禁煙補助薬より多いと報告され（PLoS One 2011; e27016）、適応が制限されつつある。従って、これら中枢性有害作用は、バレニクリンによる禁煙治療推進の障壁となっており、この中枢性有害作用の発現機序を解明し、安全性対策構築へと繋げることが急務である。バレニクリンは、ドパミン（DA）神経終末の $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介して DA 遊離を促進し、喫煙ニコチンの阻害作用とも併せて禁煙治療に優れた効果を発揮する。バレニクリンは脳神経に直接作用し薬効を現すことから、中枢性有害作用も神経直接作用に起因すると予測される。しかし、その矛盾を指摘する根拠となる報告や総説がある。すなわち、①バレニク

リンは、海馬・大脳皮質において $\alpha 4\beta 2$ nAChR を刺激し、情動障害の改善に寄与する GABA 神経を活性化する（Neuropsychopharmacology, 2011; 36: 1366）。②大脳辺縁系における $\alpha 4$ サブユニットを含む nAChR 及び $\alpha 4\beta 2$ nAChR の刺激は、それぞれ不安及び抑うつ行動を軽減する（Journal of Medical Chemistry, 2005; 48: 4705, Neuropsychopharmacology, 2000; 22: 451）。このように、バレニクリンによる情動障害改善効果を示唆する報告を考えれば、その有害作用を神経直接作用だけに限局して捉えることは困難である。それではバレニクリンの中枢性有害作用はどのように惹起されるのか？本申請者は、この中枢性有害作用には、バレニクリンの神経直接作用以外に、神経と協働する血液脳関門（BBB）構成細胞が関与すると考え、その作用標的として「脳神経血管機構」に着目した。この機構（neurovascular unit）は、脳神経細胞と BBB 構成細胞（脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト）から構成される。後者は、循環血液と脳実質を隔てる「関門」を構築し、神経細胞と協働して重要な脳機能を担っている（Neuron, 2008; 57: 178）。BBB 機能障害は、抑うつ・自殺念慮などの情動障害の重篤度と相関し（PLoS One 2010; e11089）、また喫煙により疾患のリスクが増大する糖尿病・動脈硬化・COPD などの「喫煙リスク疾患」においても BBB の脆弱化が認められる。本申請者は、BBB 機構を支えるペリサイトがバレニクリンの標的受容体 nAChR $\alpha 4$ サブユニットを極めて大量に発現することを突き止めた。本研究では、BBB 機構を構成するペリサイトを「バレニクリン副作用感受性細胞」として捉え、喫煙リスク疾患の BBB 脆弱性を背景としたバレニクリンによる本機構の破綻が中枢性有害作用発現へと誘導する可能性を追究する。

本研究では、ペリサイトを「バレニクリン副作用感受性細胞」として捉え、バレニクリンにより微小な BBB 障害が生じ、これを契機に血液由来毒性因子の流入・脳神

経血管機構障害が段階的に進展し、中枢性有害作用が発現するとの仮説を提起した。そこで、①脳血管内皮細胞を標的としたバレニクリンによるBBB機能変化、②バレニクリンによるペリサイトのBBB機能修飾作用の変化、について検討することを企てた。すなわち、本研究では脳血管内皮細胞及びペリサイトにおいて、バレニクリンの標的受容体である $\alpha 7$ nAChRおよび $\alpha 4\beta 2$ nAChRに対する役割を明らかにし、バレニクリンによるBBB機能障害を契機とした脳神経血管機構の破綻が中枢性有害作用発現へと導く可能性とその責任受容体を明らかにする。

<方法>

(1)初代培養BBB細胞のnAChRサブユニット発現量変動：脳血管内皮細胞 (RBEC)、ペリサイト及びアストロサイトはそれぞれ3週齢及び生後1-2日のwistar ratから単離培養した。これらを用いて各細胞におけるnAChRサブユニット ($\alpha 4$, $\beta 2$, $\alpha 7$) のタンパク発現量をwestern blot法で測定した。

(2)脳血管内皮細胞に対するnAChRアゴニストの作用：初代培養により脳血管内皮細胞を単離培養後、24 transwell plate (Corning) を用いてin vitro BBBモデルを作製した。このモデルを用いて、①経内皮電気抵抗値 (TEER) 及びNa-F (sodium fluorescein)、EBA (evans blue-albumin) の透過係数、②脳血管内皮細胞に発現する密着結合構成蛋白質 (ZO-1, occludin, claudin-5) の発現量を指標として脳血管内皮細胞の $\alpha 7$ および $\alpha 4\beta 2$ nAChRを介した刺激がBBB機能に及ぼす影響を検討した。

(3)ペリサイトに対するnAChRアゴニストの作用：ペリサイトに $\alpha 7$ および $\alpha 4\beta 2$ nAChR選択的アゴニストをそれぞれ負荷し、24時間後に培養上清中に存在する血液脳関門障害因子である基底膜分解酵素MMP-9量を指標として各nAChRの役割を検討した。また、炎症性サイトカインであるTNF- α と各nAChRアゴニストを同時に処理し、TNF- α 誘発性MMP-9産生量の変化を指標として炎症病態下におけるnAChRの役割を評価した。

(4)正常マウスにおけるバレニクリンのBBBに対する作用：正常動物に ^{14}C イヌリン (血液脳関門非透過性マーカー) および ^3H CsA (P-糖タンパク質基質) をバレニクリンと同時に静脈内投与し、30分後のイヌリン及びシクロスポリン (CsA) の脳/血清比を測定し、BBBにおけるタイトジャンクション及びP-糖タンパク質の機能を評価した。

<結果および考察>

(1)BBB構成細胞間のnAChR発現量の差異：

BBB機構を構成する脳血管内皮細胞 (RBEC)、ペリサイト、アストロサイトにおいてバレニクリン標的受容体である $\alpha 4$, $\beta 2$, $\alpha 7$ の各 nAChRサブユニットの発現が認められた。特にペリサイトは他のBBB構成細胞と比較して $\alpha 4$ および $\beta 2$ nAChRが多く発現していた (Fig. 1)。従って、脳血管構成細胞にはバレニクリン標的受容体である $\alpha 7$ nAChR、 $\alpha 4\beta 2$ nAChRの両サブタイプが発現しており、特に $\alpha 4\beta 2$ nAChRの発現がペリサイトにおいて最も多かった。以上より、BBB構成細胞の中ではペリサイトが、バレニクリンに対して高感受性である可能性が示唆された。

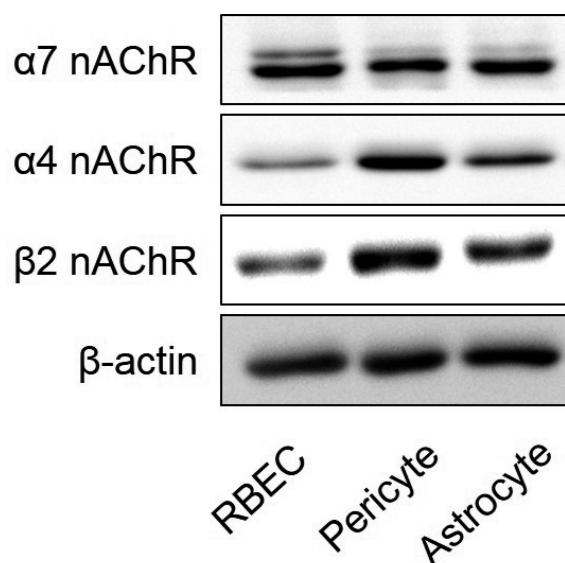


Fig. 1 BBB構成細胞におけるnAChR発現

(2)nAChRアゴニストによる脳血管内皮細胞透過性の変化：

脳血管内皮細胞に $\alpha 7$ nAChR選択的アゴニスト PHA543613を24時間処理すると、TEER値の上昇及びNa-F、EBA透過係数の低下が認められた (Fig. 2)。また、脳血管内皮細胞の $\alpha 7$ nAChR及びclaudin-5のタンパク発現量は増加した。従って、 $\alpha 7$ nAChRを介した作用によって、これらの発現量が増加し、バリア機能を亢進させることが示唆された。一方、96時間後ではTEERの低下及びNa-F、EBA透過係数の上昇が認められた。24時間後と比較して密着結合タンパク質の発現量は変化していなかったが、 $\alpha 7$ nAChRは減少していた。従って、 $\alpha 7$ nAChRの短時間刺激はBBB機能を亢進するが、長時間刺激は $\alpha 7$ nAChRのダウンレギュレーションを惹き起こしBBB機能亢進作用の消失さらにはBBB機能低下へと導くことが考えられる。

一方、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR選択的アゴニスト5-iodo-A85380は、TEER値及びNa-F、EBA透過係数、密着結合タンパク質の発現量を変化させなかった (Fig. 2)。

これらの結果から、バレンクリン標的受容体のなかで $\alpha 7$ nAChR を介することで脳血管内皮細胞のバリア機能を亢進させるが、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR はこの作用には関与しないことが明らかとなった。よって、バレンクリンは $\alpha 7$ nAChR サブタイプを介してBBB機能を修飾する可能性が考えられる。

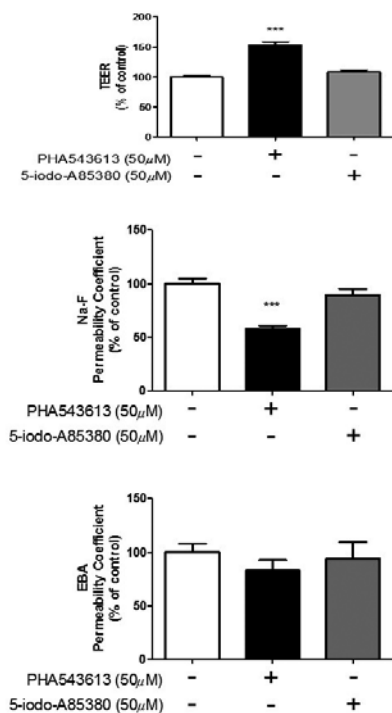


Fig. 2 nAChRアゴニストによる脳血管細胞透過性の変化

(3) ペリサイトに対する nAChRアゴニストの作用：

① nAChRのBBB障害因子MMP-9産生への影響：
 $\alpha 7$ nAChRアゴニストPHA543613に応答しペリサイトはMMP-9を産生したが、 $\alpha 4\beta 2$ nAChRアゴニスト5-iodo-A85380によるペリサイトのMMP-9産生は認められなかった。従って、バレンクリンの標的受容体である $\alpha 7$ nAChR を介した刺激は、ペリサイトのMMP-9の産生を亢進させ、血液脳関門障害を誘発する可能性が示唆される。

② TNF- α 誘発性MMP-9産生に対するnAChRの作用：我々は血液脳関門構成細胞においてペリサイトが最も炎症性サイトカインTNF- α に高感受性であり、TNF- α の刺激により他の細胞に比べて多くのMMP-9を産生することをすでに明らかにしている。このペリサイトによるTNF- α 誘発性MMP-9産生に対する各nAChRサブタイプの関与を検討した。 $\alpha 7$ nAChRアゴニストはp38 MAPK活性化を増幅してTNF- α 誘発性MMP-9産生に対して促進的に働くが、 $\alpha 4\beta 2$ nAChRアゴニストはAkt活性化を阻害し抑制的に働くことが明らかになった。この $\alpha 4\beta 2$ nAChRアゴニ

ストによるMMP-9産生の抑制にはTNF受容体の発現抑制も関与していた。

(4) 脳血管内皮細胞/ペリサイト共培養BBBモデルに対する $\alpha 7$ nAChRアゴニストの作用：

ペリサイト共存下で $\alpha 7$ nAChRアゴニストPHA543613を脳血管内皮細胞に長時間処理すると、脳血管内皮細胞単独培養時よりもNa-F透過性の上昇が認められた (Fig. 3)。ペリサイトはMMP-9産生および脳血管内皮細胞 $\alpha 7$ nAChRのダウンレギュレーションを促進し、 $\alpha 7$ nAChR を介したバリア機能低下を増悪させる可能性がある。

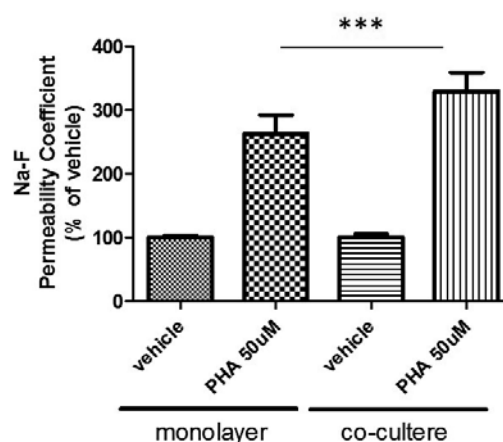


Fig. 3 脳血管内皮細胞/ペリサイト共培養における $\alpha 7$ nAChRアゴニストによる透過性の変化

(5) 正常マウスにおけるバレンクリンのBBB機能に対する作用：

バレンクリンを正常マウスに単回投与すると、 $[^{14}\text{C}]$ イヌリンの脳/血清比に対して影響を与えず、 $[^3\text{H}]$ CsAの脳/血清比を増加させた。従って、バレンクリンは常態下におけるBBBの密着結合能に対して影響を及ぼさないが、P-糖タンパク質の排出機能を阻害することが判った。P-gpの基質となる血液由来毒性因子がバレンクリン投与によって脳実質内へ移行し、中枢性有害作用発現を誘発する可能性が示唆される。一方、バレンクリンは密着結合能に影響を与えなかったが、炎症性メディエーターが増加するCOPDなどの喫煙リスク疾患におけるバレンクリンの影響は不明である。バレンクリン暴露時間の問題も含めた病態依存的な作用などの検討がさらに必要である。

本研究成績は、BBB構成細胞である脳血管内皮細胞及びペリサイトの $\alpha 7$ nAChR刺激がBBB機能障害に関与することを明らかにし、バレンクリンが $\alpha 7$ nAChRを介してBBB機能障害を惹き起こす可能性を示唆するものであった。バレンクリン誘発性BBB機能障害発現

機序を解明する上で、神経細胞やミクログリアのBBB機能への影響やBBBの $\alpha 7$ nAChR優位となる病態等を明らかにすることが必要である。以上、本研究はバレニクリンによるBBB機能障害発現の標的受容体として $\alpha 7$ nAChRを提示した点で意義深い。

<研究業績>

論文

- 1) Koga M, Kanaoka Y, Ohkido Y, Kubo N, Ohishi K, Sugiyama K, Yamauchi A, Kataoka Y. Varenicline aggravates plaque formation through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in ApoE KO mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 455(3-4): 194-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.150.
- 2) Takata F, Tominaga K, Koga M, Dohgu S, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y. Elevated permeability of the blood-brain barrier in mice intratracheally administered porcine pancreatic elastase. *J Pharmacol Sci.* 2015; 129(1): 78-81. doi: 10.1016/j.jphs.2015.08.008.
- 3) Dohgu S, Takata F, Kataoka Y, Brain pericytes regulate the blood-brain barrier function. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2015; 146(1): 63-5. doi: 10.1254/fpj.146.63
- 4) Machida T, Takata F, Matsumoto J, Takenoshita H, Kimura I, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Brain pericytes are the most thrombin-sensitive matrix metalloproteinase-9-releasing cell type constituting the blood-brain barrier in vitro. *Neurosci Lett.* 2015; 599: 109-14. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.028.
- 5) Takahashi H, Takata F, Matsumoto J, Machida T, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Brain pericyte-derived soluble factors enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 457, 532-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.016.
- 6) Tóth AE, Tóth A, Walter FR, Kiss L, Veszeka S, Ózsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA. Compounds blocking methylglyoxal-induced protein modification and brain endothelial injury. *Arch Med Res.* 2014; 45, 753-64. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.10.009.
- 7) Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszeka S, Nagy L, Puskás LG, Couraud PO, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA. Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One.* 2014; 9(7): e100152
- 8) Matsumoto J, Takata F, Machida T, Takahashi H, Soejima Y, Funakoshi M, Futagami K, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett.* 2014; 578: 133-8

学会発表

- 1) 木村郁哉, 道具伸也, 高田美友子, 松本純一, 川原庸平, 山内淳史, 片岡泰文、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体によるBBB機能の亢進、第136回日本薬学会年会、2016 3月26-29日、パシフィコ横浜
- 2) 金岡祐輝, 古賀允久, 山内淳史, 片岡泰文、バレニクリンはマクロファージにおける酸化LDLによる泡沫化を促進する、第136回日本薬学会年会、2016 3月26-29日、パシフィコ横浜
- 3) 道具伸也, 町田 崇, 高田美友子, 木村郁哉, 松本純一, 山内淳史, 片岡泰文、脳ペリサイトのPAR1-PKC δ / θ シグナルはトロンビン誘発性MMP-9産生及び血液脳関門障害に関与する、第89回日本薬理学会年会 2016 3月9-11日、パシフィコ横浜
- 4) 古瀬由奈, 道具伸也, 高田美友子, 松本純一, 木村郁哉, 吉田 愛, 有留尚孝, 岩尾悠可, 納富 夕, 山内淳史, 片岡泰文、IL-1 β およびTNF- α による血液脳関門機能障害における細胞内情報伝達機構、第68回日本薬理学会西南部会 2015 11月21日、下関
- 5) 江島優佳, 古賀允久, 金岡祐輝, 久永真美, 田代哲士, 橋爪 渚, 山内淳史, 片岡泰文、血管内皮細胞における禁煙補助薬バレニクリンの遊走作用、第68回日本薬理学会西南部会 2015 11月21日、下関
- 6) 高田美友子、松本純一、道具伸也、町田 崇、山内淳史、片岡泰文、脳ペリサイトはTNF- α に応答してミクログリアを活性化させる、第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日 名古屋国際会議場
- 7) 松本純一、道具伸也、高田美友子、町田 崇、二神幸次郎、山内淳史、片岡泰文、脳ペリサイトはTNF- α に応答してグリア細胞より多量のIL-6を遊離する—脳ペリサイトのIL-6産生における細胞内シグナル

経路の役割—第88回日本薬理学会年会 2015年3月
20日 名古屋国際会議場

- 8) 町田 崇、道具伸也、高田美友子、松本純一、平田亮介、
宮村知幸、山内淳史、片岡泰文、糖尿病によるBBB
機能不全におけるトロンビン反応性脳ペリサイトの
役割、第88回日本薬理学会年会 2015年3月20日
名古屋国際会議場
- 9) 金岡祐輝、古賀允久、大石かおる、杉山慶太、江島優佳、
久永真未、山内淳史、片岡泰文、バレニクリンによ
る $\alpha 7$ nAChR を介する動脈硬化巣形成の増悪作用、
第135回日本薬学会年会 2015年3月 神戸
- 10) 高田美友子、道具伸也、松本純一、町田 崇、山内
淳史、片岡泰文、AMPK活性化を介したメトホル
ミンの血液脳関門機能強化作用、第3回日本くすり
と糖尿病学会学術集会 2014年11月2日 アクロス
福岡
- 11) 金岡祐輝、古賀允久、大石かおる、杉山慶太、江島
優佳、久永真未、山内淳史、片岡泰文、禁煙補助薬
バレニクリンによる心血管系有害事象、第67回日本
薬理学会西南部会 2014年11月 産業医科大学

<謝辞>

本研究の一部は福岡大学研究推進部の研究経費による
ものである。(課題番号：137107)