

氏名	かなおか ゆうき 金岡 祐輝		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1668 号		
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	An adverse action of varenicline, a prescription medication for smoking cessation, on the atherosclerotic plaque formation (禁煙補助薬バレニクリンの心血管系有害作用に関する研究)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	片岡 泰文
	(副査) 福岡大学	教授	岩崎 克典
	福岡大学	教授	三島 健一
	福岡大学	准教授	山内 淳史

## 内 容 の 要 旨

### 【緒言】

2016 年の全国たばこ喫煙者率調査によると、喫煙人口は 2027 万人と推定され、国民の約 5 人に 1 人が喫煙者である。喫煙と心疾患には密接な関係があり、喫煙により oxidized low density lipoprotein (oxLDL) コレステロールの血管内への蓄積、血中 HDL コレステロールの低下、血管収縮による血圧上昇などを誘発する。その結果、動脈硬化巣が進展・不安定化し、心筋梗塞や脳梗塞などの心血管イベントを惹起する。禁煙は循環器系疾患患者の心血管イベント発症の危険性を低下させるため、最も経済的かつ効果的な方法である。従来の禁煙治療は、ニコチン補給によるドーパミン欠乏の禁断症状を軽減させるニコチン代替療法（ニコチンガム、ニコチンパッチなど）が主流であったが、皮膚への影響や使用方法が複雑であり、不安定狭心症や急性期の心筋梗塞の患者、脳血管障害回復期初期の患者には使用できない。一方、2008 年に承認された禁煙補助薬バレニクリンは、 $\alpha_4\beta_2$  ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 部分作動薬および  $\alpha_7$  nAChR 完全作動薬であり、ニコチン代替療法よりも禁煙成功率が高く、ニコチンを含まないため、ニコチン代替療法が使用できない心疾患患者にも使用可能である。このようにバレニクリンは画期的で有効性かつ安全性も高いため、本薬物による禁煙治療が近年増加している。しかし、バレニクリンは嘔気、便秘、不眠、悪夢などの軽度から中等度症状の副作用を呈する。その一方で、特に動脈硬化症に併発する心血管イベントの危険性が増大するという重篤な副作用も報告されている。禁煙するためにバレニクリンを服用しているにもかかわらず、逆に心血管イベント発症の危険性を増大させることは極めて問題である。さらにバレニクリン禁煙療法が実施される患者数、バレニクリン禁煙療法の必要性に迫られる循環器疾患、呼吸器疾患などの患者背景を考慮すれば、この副作用の予防・軽減・回避対策の構築が急務である。

しかし、その対策立案に不可欠な発症機序の解明に関する基礎研究は殆どない。

そこで本研究は、バレニクリンによる心血管イベント発症機序を明らかにし、副作用の予測・軽減・回避対策の構築また新薬研究の展開へとつながる手がかりを探索することを目標とした。

## 第1章 バレニクリンによる心血管イベント発症機序の検討

### (1) バレニクリンによる動脈硬化巣の形成・進展

動脈硬化モデルマウスである Apolipoprotein E knockout (ApoE KO) マウスを用いた。8週齢時より高脂肪食の負荷を開始し、同時に生理食塩水に溶解したバレニクリン 0.05mg / kg / day (低用量)、0.5mg / kg / day (高用量)をそれぞれ3週間連続で皮下投与した。vehicle 群として、生理食塩水を同様に投与した。11週齢時に動脈硬化巣を評価した。

赤は動脈硬化巣を示す (Fig. 1A)。vehicle 群 ( $5.4 \pm 2.0\%$ )、低用量バレニクリン群 ( $4.7 \pm 1.0\%$ ) と比較して、高用量バレニクリン投与群 ( $8.3 \pm 3.4\%$ ) では動脈硬化巣の形成が有意に増加した。一方、vehicle 群と低用量バレニクリン投与群との両群間では動脈硬化巣面積の割合に差はなかった (Fig. 1B)。

大動脈弓においても同様に、コントロール群、低用量バレニクリン群と比較して高用量バレニクリン投与により、動脈硬化巣の形成が有意に増加した (Fig. 1C)。

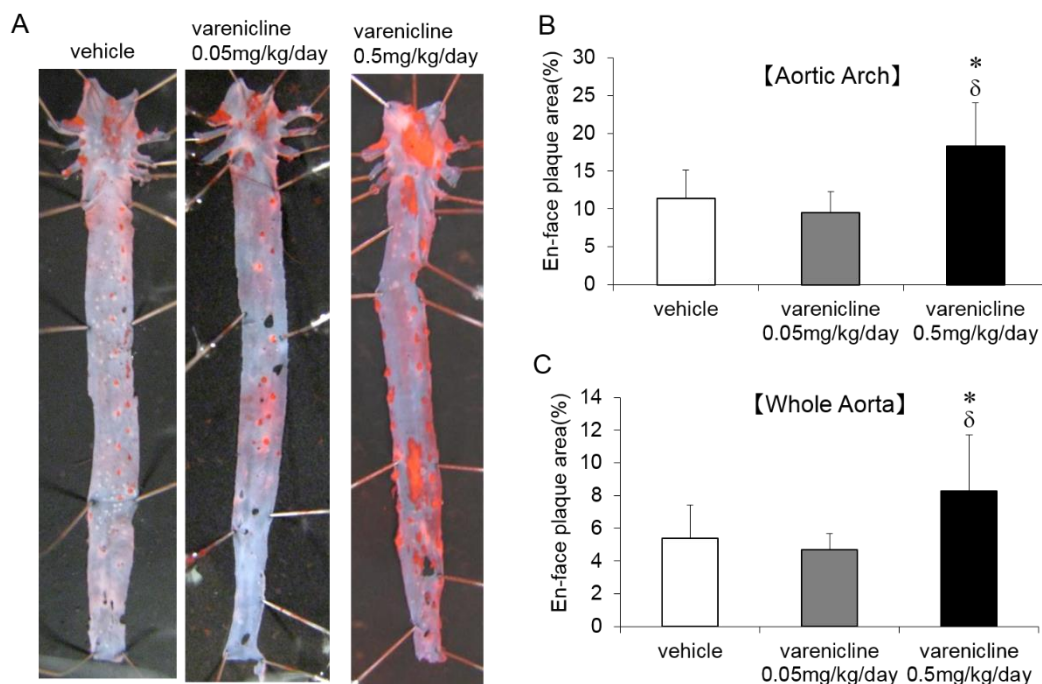


Fig. 1 Atherosclerotic plaques in the aorta of varenicline-treated ApoE KO mice.

(A) Representative *en face* photographs of the aorta showing oil red O-stained atherosclerotic plaques. Quantitative measurement of *en face* plaque area (%) in the aortic arch (B) and whole aorta (C). Each bar indicates mean  $\pm$  S.D. (n=8-9) \* $P < 0.05$  vs vehicle group,  $\delta P < 0.05$  vs 0.05 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> varenicline treatment group.

## (2) $\alpha_7$ nAChR を介したバレニクリンによる動脈硬化巣形成の促進

バレニクリンの $\alpha_7$  nAChR に対する 50%有効量は、 $\alpha_4\beta_2$  nAChR と比較して約 8 倍高いものの、 $\alpha_7$  nAChR の刺激効果は約 95%と非常に高いため、バレニクリンが $\alpha_7$  nAChR にも十分な効果をもつ可能性がある。 $\alpha_7$  nAChR は、動脈硬化症に関連する血管内皮細胞、マクロファージ、血管平滑筋細胞に発現している。以上より、バレニクリンが $\alpha_7$  nAChR を介して動脈硬化巣形成の促進に寄与することが考えられる。そこで、同様のプロトコルで $\alpha_7$  nAChR のアンタゴニストである MLA (5mg/kg/day) とバレニクリン (0.5mg/kg/day)を併用し、動脈硬化巣を評価した。

バレニクリン投与群では vehicle 群と比較して、全大動脈、大動脈弓における動脈硬化巣の形成は有意に促進した(Fig.2)。一方、MLA を併用することにより、バレニクリンによる動脈硬化巣の形成は有意に減少していた (Fig.2)。さらに、大動脈起始部においても、バレニクリンにより動脈硬化巣の形成は有意に促進し、MLA によりバレニクリンによる動脈硬化巣形成は抑制された (Fig.3)。以上より、動脈硬化モデルマウスにおいて、バレニクリンは $\alpha_7$  nAChR を介して、動脈硬化巣形成を促進することが明らかとなった。

## (3) バレニクリンの体重および血中コレステロール値に与える影響

バレニクリンおよび MLA 投与により、体重、総コレステロール値に影響を及ぼさなかった (Table.1)。この結果より、バレニクリンは体内脂肪およびコレステロール値に関係なく動脈硬化巣形成を促進させることが示唆された。

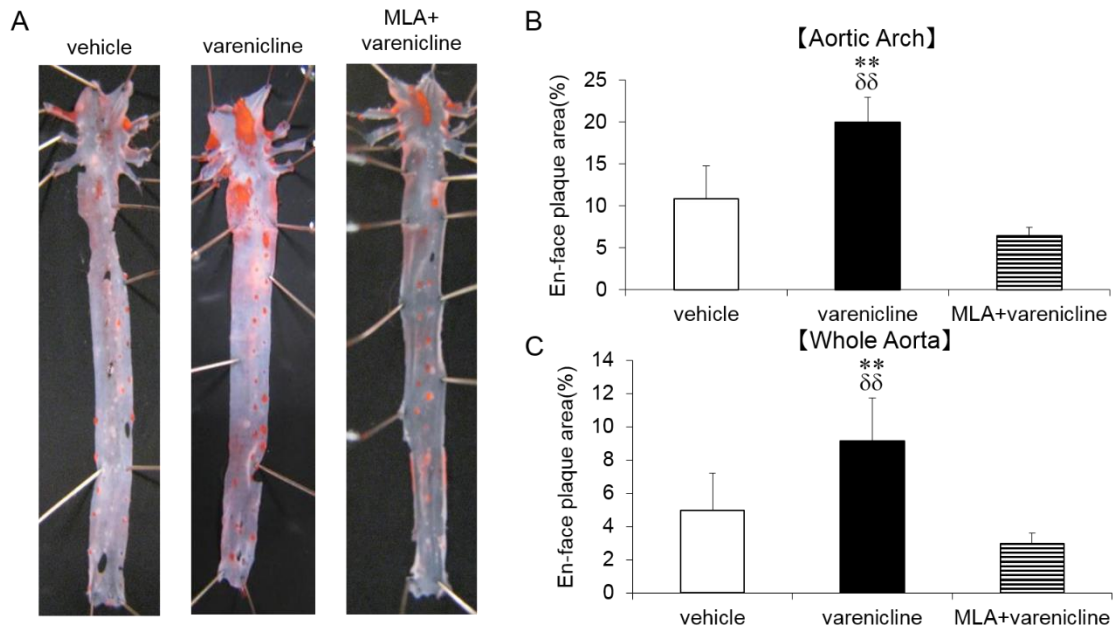


Fig. 2. Atherosclerotic plaques in the aorta of varenicline- and varenicline plus MLA-treated ApoE KO mice.

(A) Representative *en face* photographs of the aorta showing oil red O-stained atherosclerotic plaques from vehicle, varenicline, and varenicline + MLA-treated ApoE KO mice. Pooled data showing the effect of varenicline and MLA treatment on oil red O-stained positive areas in the aortic arch (B) and whole aorta (C). Each bar indicates mean  $\pm$  S.D. (n=8-9)  $**P < 0.01$  vs vehicle group,  $\delta\delta P < 0.01$  vs varenicline treatment group.

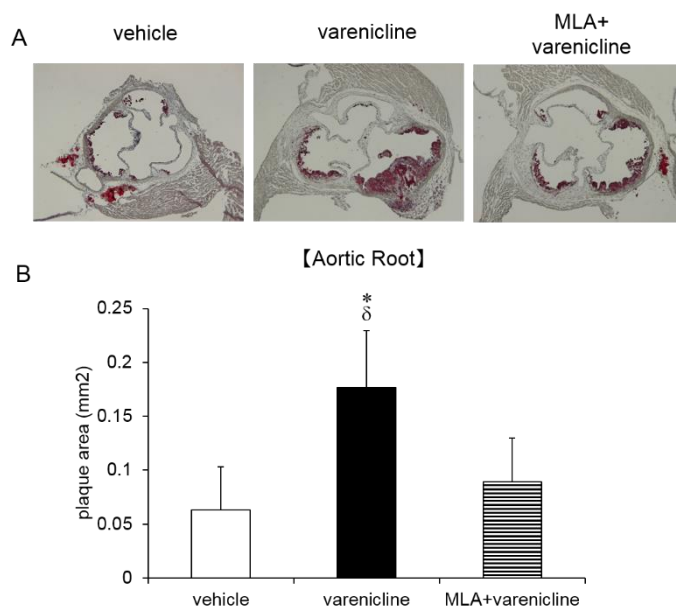


Fig. 3 Atherosclerotic plaques in the aorta of varenicline- and varenicline plus MLA-treated ApoE KO mice. (A) Representative cross-sections of oil red O-stained plaques in the aortic root. (B) Pooled data of plaque area in the aortic root. Each bar indicates mean  $\pm$  S.D. (n=9-10)  $*P < 0.05$  vs vehicle group,  $\delta P < 0.05$  vs varenicline treatment group.

	vehicle	varenicline	MLA + varenicline
Body Weight, g	18.4±2.6	18.4 ± 1.9	18.7 ± 2.6
Total Cholesterol, mg/dl	1952 ± 306	1920 ± 374	1997 ± 454

Table.1 There are no significant differences in body weight or total cholesterol between groups. Data are expressed as mean ± S.D. (n=9-10)

## 第2章 マクロファージにおけるバレニクリンの作用の解明

動脈硬化症は炎症性疾患の1つであり、内膜のマクロファージなどの炎症性細胞が動脈硬化巣の形成・進展、不安定化に大きく寄与している。マクロファージは、スカベンジャー受容体 (LOX-1、CD36、SR-A) を介して oxLDL を取り込む。oxLDL を取り込んだマクロファージは泡沫化し、炎症性サイトカインを分泌し、動脈硬化巣を進展させる。

### (1) バレニクリンによるスカベンジャー受容体発現および oxLDL 取り込み

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 cells にバレニクリンを濃度依存的に処理し、スカベンジャー受容体 (LOX-1、CD36、SR-A) のタンパク発現量を比較検討した。RAW264.7 cells において、バレニクリンは濃度依存的に LOX-1 および CD36 のタンパク質発現を増加させた (Fig.4)。しかし、SR-A タンパク質発現には変化がなかった。バレニクリン 10 $\mu$ M 処理により、LOX-1 および CD36 のタンパク質発現を最も増加させたため、バレニクリンの処理濃度を 10 $\mu$ M と決定し、以下の実験を行った。マクロファージにおける oxLDL の取り込み作用を検討するため、マウス腹腔マクロファージにバレニクリンを処理し、oxLDL を取り込ませた。oxLDL を取り込んだマクロファージを oil red-O 染色で特定し、oil red-O 陽性細胞数により比較検討した。oil red-O 陽性細胞数は、vehicle 群において 12%であったが、バレニクリン処理において 21%と有意に増加させた。また oxLDL 未添加群では、oil red-O 陽性細胞はほとんど観察されなかった (Fig. 5)。

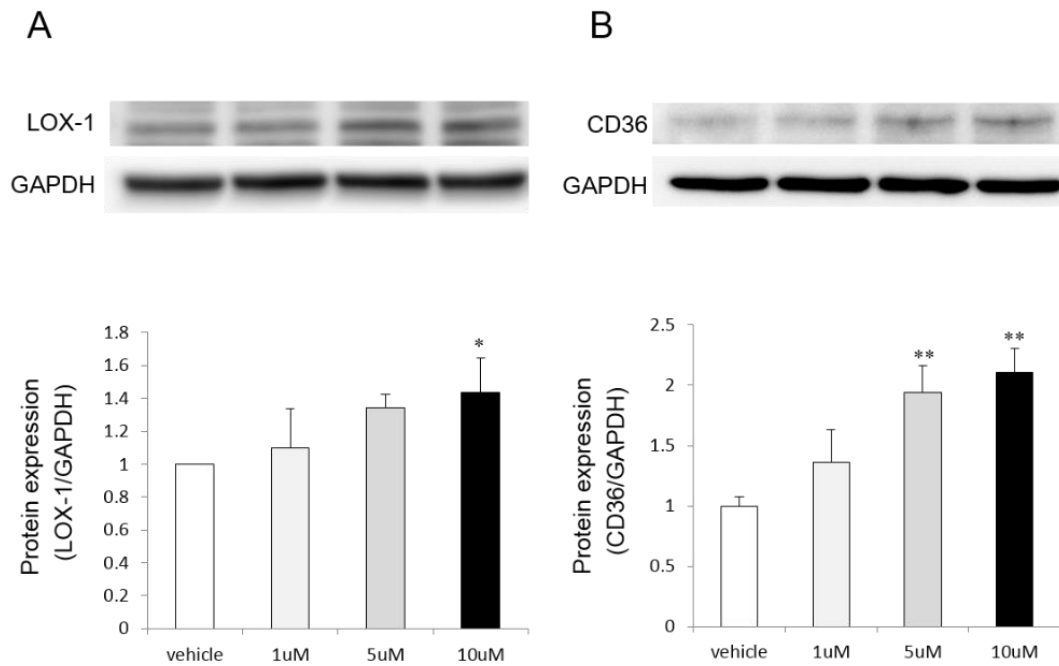


Fig.4. Effect of varenicline on expression of LOX-1 and CD36 in RAW264.7 cells.

(A and B) Representative immunoblots (upper panel) and quantitative analyses of band intensities (bottom panel) showing protein expression of LOX-1 and CD36, respectively. Cells were treated with vehicle or varenicline (1–10  $\mu$ M) for 24 h. (C and D) Bar graphs showing quantitative real-time RT-PCR analyses of the mRNA expression of LOX-1 and CD36, respectively. Cells were treated with vehicle or varenicline (10  $\mu$ M) for 24 h. Results are expressed as percentage of vehicle-treated cells. GAPDH was used as a loading control. Each bar indicates mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01: significant difference from vehicle.

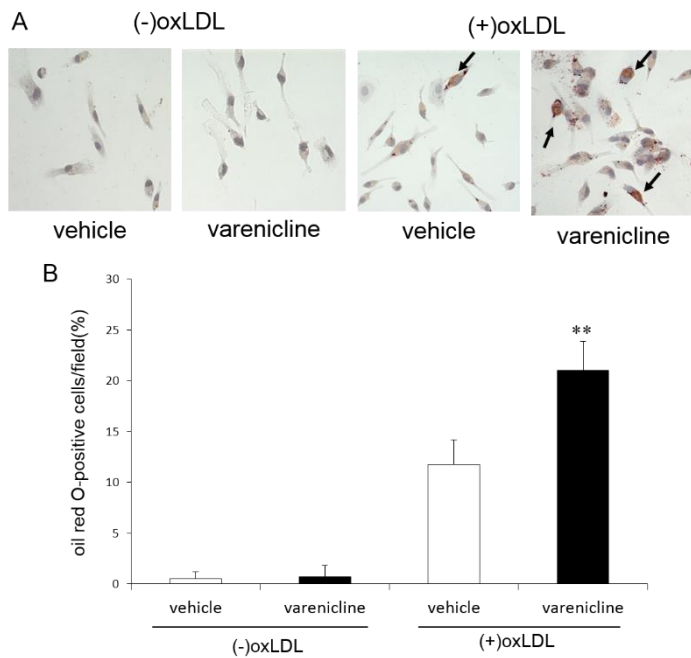


Fig.5. (A) Representative photographs showing macrophages stained with oil red O and hematoxylin in the absence (-) and presence (+) of oxLDL (80  $\mu$ g/mL) for 24 h (left and right panel, respectively). Peritoneal macrophages were treated with vehicle or varenicline (10  $\mu$ M) for 24 h (upper and bottom panel, respectively). Arrowheads show oil red O-positive cells in representative images. (B) Quantitative analyses of oxLDL uptake in macrophages.

Results are expressed as a percentage of oil red O-labeled cells in total cells. Each bar indicates mean  $\pm$  SD (n=4). \*\*P<0.01: significant difference from (+) oxLDL-vehicle.

## (2) $\alpha_7$ nAChR を介したバレニクリンによる oxLDL 取り込みおよび LOX-1, CD36 発現

我々は、前章でバレニクリンは $\alpha_7$  nAChR を介して動脈硬化巣形成を促進させることを明らかにした。そこで、マクロファージにおいて、バレニクリンによる oxLDL の取り込み促進に $\alpha_7$  nAChR が寄与すると仮説を立てた。RAW264.7 cells に $\alpha_7$  nAChR アンタゴニスト (MLA) および $\alpha_4\beta_2$  nAChR アンタゴニスト (DH $\beta$ E) を 30 分間、前処理した。その後、バレニクリン処理を行い、LOX-1、CD36 のタンパク質発現および oxLDL 取り込みについて比較検討した。バレニクリンによる LOX-1 および CD36 の発現増加は、MLA により有意に減少していた(Fig. 6A, B)。しかし、DH $\beta$ E は、これらのタンパク発現増加を抑制しなかった (Fig. 6C,D)。さらに、MLA はバレニクリンによるマクロファージの oxLDL の取り込み促進を有意に抑制したが、DH $\beta$ E は抑制しなかった (Fig.7)。

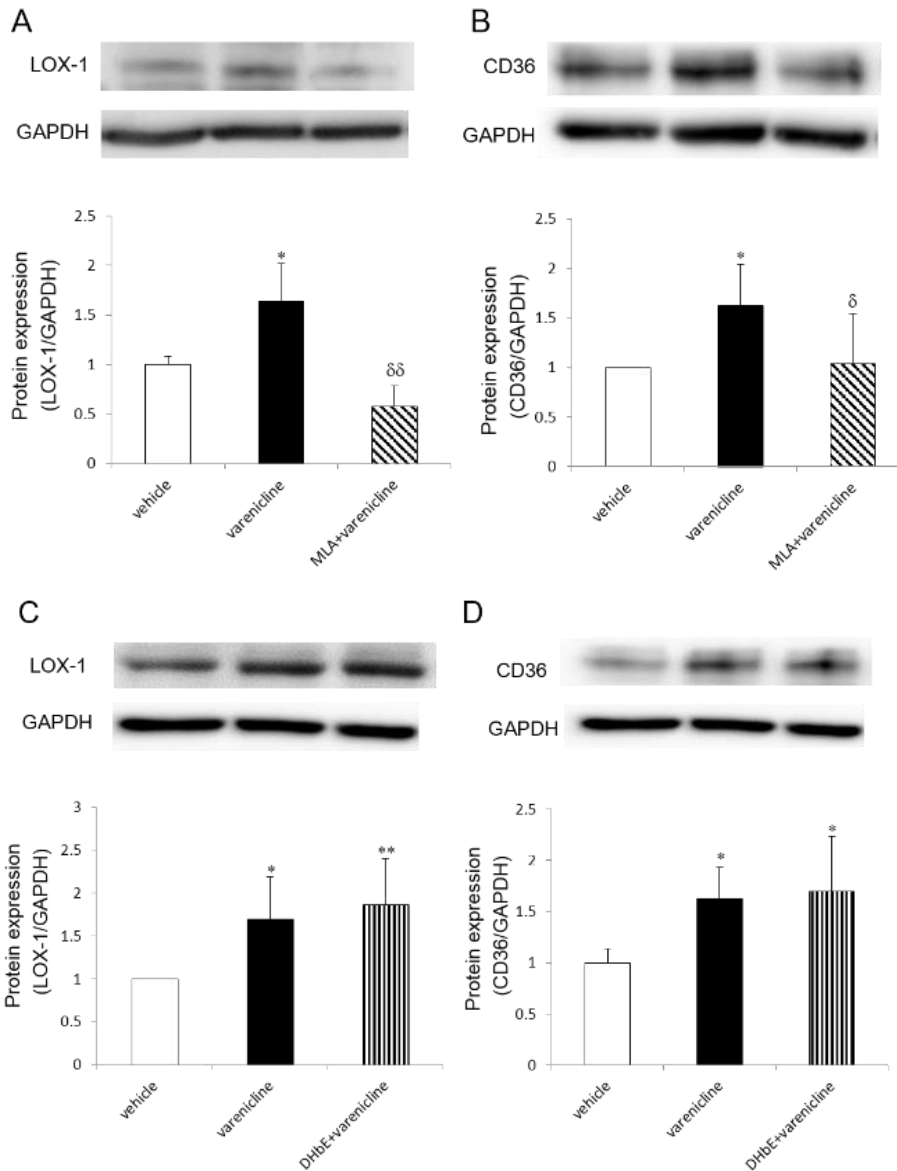


Fig.6. Effect of  $\alpha_7$  (A and B) and  $\alpha_4\beta_2$  nAChR (C and D) antagonists on varenicline-increased expression of LOX-1 and CD36 protein (left and right panel, respectively) in RAW 264.7 cells. Cells were treated with vehicle or varenicline (10  $\mu$ M) for 24 h in the absence or presence of the  $\alpha_7$  nAChR antagonist MLA (50 nM) or the  $\alpha_4\beta_2$  nAChR antagonist DH $\beta$ E (1  $\mu$ M). MLA and DH $\beta$ E were added to cells 30 min before treatment with vehicle or varenicline. Representative immunoblots (upper) and quantitative analyses of band intensities (lower) showing protein expression of LOX-1 and CD36 in RAW264.7 cells. Each bar indicates mean  $\pm$  SD (n = 3–6). \*P<0.05, \*\*P<0.01: significant difference from vehicle.  $\delta$ P<0.05,  $\delta\delta$ P<0.01: significant difference from varenicline.



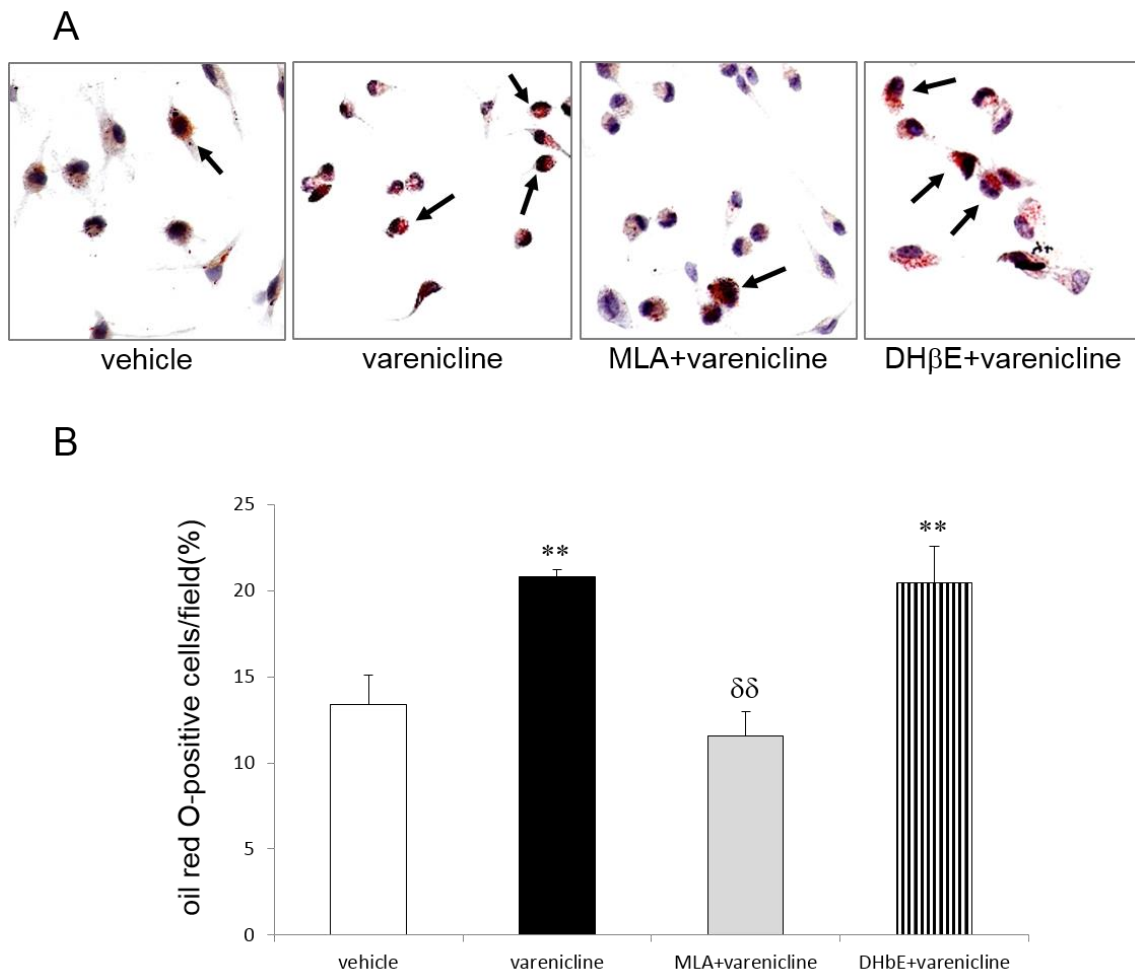


Fig.7. Effect of  $\alpha_7$  and  $\alpha_4\beta_2$  nAChR antagonists on varenicline-increased oxLDL uptake in macrophages. (A) Representative photographs showing macrophages stained with oil red O and hematoxylin. Arrowheads show oil red O-positive cells in representative images. (B) Quantitative analyses of oxLDL uptake in macrophages incubated with oxLDL (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h. Cells were treated with vehicle or varenicline (10  $\mu\text{M}$ ) for 24 h in the absence or presence of the  $\alpha_7$  nAChR antagonist MLA (50 nM) or the  $\alpha_4\beta_2$  nAChR antagonist DHβE (1  $\mu\text{M}$ ). MLA and DHβE were added to cells 30 min before treatment with vehicle or varenicline. Each bar indicates mean  $\pm$  SD (n = 4). \*\*P<0.01: significant difference from vehicle.  $\delta\delta$ P<0.01: significant difference from varenicline.

## 【総括】

循環器系疾患における禁煙療法の重要性は、十分認知されているにもかかわらず、その効果的治療の選択肢は狭い。 $\alpha_4\beta_2$  nAChR の部分作動薬バレニクリンの登場は画期的であり、その禁煙効果についても特筆できる。循環器系疾患、なかでも心血管障害における禁煙治療の重要性を考慮すれば、バレニクリンによる心血管イベント発症の予防・軽減・回避対策の構築は急務であるが、発症機序に関する基礎研究も殆どないのが現状である。

本研究では、第1章にてバレニクリンによる心血管イベント発症の有害事象を検討した。ApoE KO マウスの大動脈において、高用量 (0.5mg/kg/day) のバレニクリン投与により、動脈硬化巣の形成は有意に促進した。また $\alpha_7$  nAChR アンタゴニスト(MLA)併用により、バレニクリンによる動脈硬化巣の形成が抑制されたことから、バレニクリンは $\alpha_7$  nAChR を介して動脈硬化巣の形成を促進させることが示唆された。第2章では、動脈硬化巣において重要な役割を担っているマクロファージに着目し、バレニクリンによる oxLDL の取り込み作用を検討した。マクロファージにおいて、バレニクリンは $\alpha_7$  nAChR を介して、LOX-1 および CD36 の発現を増加させることにより、oxLDL の取り込みを促進させることを明らかにした。本研究の成果により、バレニクリン有害作用の予測・軽減・回避対策の構築が可能となり、本薬物の安全性と禁煙成功率のさらなる向上が期待できる。さらに有害作用の低減化とともに優れた禁煙効果を有する新薬の開発へと繋げることも可能となる。

## 審査の結果の要旨

喫煙と心疾患には密接な関係があり、喫煙により oxidized low density lipoprotein (oxLDL) コレステロールの血管内への蓄積、血中 HDL コレステロールの低下、血管収縮による血圧上昇などを誘発する。その結果、動脈硬化巣が進展・不安定化し、心筋梗塞や脳梗塞などの心血管イベントを惹起する。禁煙は、循環器系疾患患者の心血管イベント発症の危険性を低下させる最も経済的かつ効果的な方法である。経口禁煙補助薬バレニクリンは、 $\alpha_4\beta_2$  ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 部分作動薬および $\alpha_7$  nAChR 完全作動薬であり、ニコチン代替療法よりも禁煙成功率が高く、ニコチンを含まないため、ニコチン代替療法が使用できない心疾患患者にも使用可能である。このようにバレニクリンは画期的で有効性かつ安全性も高いため、本薬物による禁煙治療が近年増加している。しかし、バレニクリンは嘔気、便秘、不眠、悪夢などの軽度から中等度症状の副作用を呈する。その一方で、特に動脈硬化症に併発する心血管イベントの危険性が増大するという重篤な副作用も報告された。従って、この副作用の予防・軽減・回避対策の構築が急務である。しかし、その対策立案に不可欠な発症機序の解明に関する基礎研究は殆どない。本申請論文は、バレニクリンによる心血管イベント発症機序を明らかにし、副作用の予測・軽減・回避対策の構築また新薬研究の展開へと繋がる手掛かりを探索することを企図したものである。

第1章では、バレニクリンによる心血管イベント発症機序について究明した。動脈硬化症モデルマウスである Apolipoprotein E knockout (ApoE KO) マウスを用い、8週齢時より高脂肪食の負荷を開始し、同時に生理食塩水に溶解したバレニクリン 0.05mg / kg / day (低用量)、0.5mg / kg / day (高用量)をそれぞれ3週間連続で皮下投与した。11週齢時に動脈硬化巣を評価した。vehicle 群、低用量バレニクリン群と比較して、高用量バレニクリン投与群では動脈硬化巣の形成が有意に増加した。以上、バレニクリンは、動脈硬化巣の形成・進展を悪化させることが明らかにされた点で意義深い。さらに、 $\alpha_7$  nAChR 拮抗薬である methyllycaconitine (MLA : 5mg/kg/day) とバレニクリン (0.5mg/kg/day)を併用し動脈硬化巣を評価した。バレニクリン投与群では vehicle 群と比較して、動脈硬化巣の形成が有意に促進された。これは、MLA 併用により有意に抑制された。以上、動脈硬化症モデルマウスにおいて、バレニクリンは、 $\alpha_7$  nAChR を介して動脈硬化巣形成を促進することが明らかにされた点で評価できる。

第2章では、マクロファージにおけるバレニクリンの作用について検討された。動脈硬化症は炎症性疾患の1つであり、内膜のマクロファージなどの炎症性細胞が動脈硬化巣の形成・進展、不安定化に大きく寄与している。マクロファージは、スカベンジャー受容体 (LOX-1、CD36、SR-A) を介して oxLDL を細胞内に取り込む。oxLDL を取り込んだマクロファージは泡沫化し、炎症性サイトカイン等を分泌し、動脈硬化巣を進展させる。そこで、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 cells にバレニクリンを処理し、LOX-1、CD36、SR-A のタンパク発現を検討した結果、バレニクリンは濃度依存的に LOX-1 およ

び CD36 のタンパク質発現を増加させることが判った。しかし、SR-A タンパク質発現には変化がなかった。バレニクリン 10 $\mu$ M 処理により、LOX-1 および CD36 のタンパク質発現を最も増加させたため、バレニクリンの処理濃度を 10 $\mu$ M と決定し、以下の実験を行った。マクロファージにおける oxLDL の取り込み作用を検討するため、マウス腹腔マクロファージにバレニクリンを処理し、oxLDL を取り込ませた。oil red-O 陽性細胞数は、vehicle 群において 12%であったが、バレニクリン処理において 21%と有意に増加した。さらに、バレニクリンがマクロファージの $\alpha_7$  nAChR を介して oxLDL の取り込みを促進する可能性について検討した。RAW264.7 cells に MLA(50nM)および $\alpha_4\beta_2$  nAChR 拮抗薬である dihydro- $\beta$ -erythroidine hydrobromide:DH $\beta$ E(1 $\mu$ M)をそれぞれ 30 分間前処理した。バレニクリンによる LOX-1 および CD36 の発現量増加は、MLA により有意に抑制された。しかし、DH $\beta$ E では、抑制されなかった。さらに、MLA はバレニクリンによる oxLDL の取り込み促進を有意に抑制した。しかし、DH $\beta$ E は抑制しなかった。バレニクリンによる oxLDL 取り込み促進の標的受容体が明らかにされた点で評価できる。

本研究では、バレニクリンによる心血管イベント発症の有害事象について追究された。ApoE KO マウスに高用量のバレニクリンを投与すると、大動脈の動脈硬化巣の形成が有意に促進された。 $\alpha_7$  nAChR 拮抗薬(MLA)併用により、バレニクリンによる動脈硬化巣の形成が抑制されたことから、バレニクリンは $\alpha_7$  nAChR を介して動脈硬化巣の形成を促進させることが示唆された。次に、動脈硬化巣において重要な役割を担っているマクロファージに着目し、バレニクリンによる oxLDL の取り込み作用を検討した。バレニクリンは、マクロファージの $\alpha_7$  nAChR を介して LOX-1 および CD36 発現を増加させることにより、その oxLDL の取り込みを促進させることが明らかにされた。これら結果より、バレニクリンは、動脈硬化巣を増大させることにより心血管イベントのリスクを増加させることが示唆された。本申請論文は、バレニクリン有害作用の予測・軽減・回避対策の構築に必要な実験証拠を提示するものとして意義深く、本薬物の安全性と禁煙成功率のさらなる向上に繋がることが期待でき、高く評価できる。

以上を総合し、本申請論文は、学位論文として適格かつ高質であると判定した。また、公聴会審査における申請者の質疑応答は、学位を授与するに応分の能力を証明するものと結論した。