

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

金岡 祐輝

福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

**An adverse action of varenicline, a prescription medication for smoking cessation,
on the atherosclerotic plaque formation****Yuki Kanaoka**Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan**Abstract**

Varenicline is one of the most widely used drugs for smoking cessation. It is a partial agonist of the $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) and full agonist of the α_7 nAChR. However, whether an adverse effect of varenicline is associated with the risk of serious cardiovascular events remains controversial. In this study, we determined if varenicline increases the risk of cardiovascular events using apolipoprotein E knockout (ApoE KO) mice. ApoE KO mice (8 weeks old) were injected with varenicline 0.5 mg/kg/day for 3 weeks. Varenicline aggravated atherosclerotic plaque formation in whole aorta of ApoE KO mice compared with vehicle. Methyllycaconitine (MLA), an α_7 nAChR antagonist, inhibited varenicline-induced aggravated plaque formation. In an effort to determine the mechanism by which varenicline increased atherosclerosis, we ascertained whether varenicline promotes oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) uptake in mouse peritoneal macrophages in vitro and clarified its mechanism. We investigated the effects of varenicline (1-10 μ M) on the expression of scavenger receptors including lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), cluster of differentiation (CD) 36 and scavenger receptor class A (SR-A) in the murine macrophage cell line RAW264.7. Expression of protein and mRNA was determined by western blotting and real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, respectively. Effects of varenicline (10 μ M) on oxLDL uptake were examined by counting the number of macrophages stained with oil red O and hematoxylin. Varenicline significantly increased expression of the protein and mRNA of LOX-1 and CD36, but not SR-A, in RAW264.7 cells, and increased oxLDL uptake in macrophages. These effects of varenicline were blocked significantly by an α_7 nAChR antagonist, MLA (50 nM), but not by an $\alpha_4\beta_2$ nAChR antagonist, dihydro- β -erythroidine hydrobromide (DH β E) (1 μ M). These data suggest that varenicline promotes oxLDL uptake by upregulating expression of LOX-1 and CD36 through α_7 nAChR in macrophages. We found that varenicline significantly activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathways in RAW264.7 cells. This activation was blocked by MLA but not DH β E. Therefore, ERK1/2-NF- κ B signaling pathway is highly likely to be responsible for varenicline-induced upregulation of the LOX-1 and CD36 expression through α_7 nAChR in macrophages. These processes probably contribute to varenicline-aggravated atherosclerotic plaque formation. Hence, an increased risk of cardiovascular events upon varenicline treatment could occur, and must be considered in patients (especially those suffering from cardiovascular diseases).

keywords : Atherosclerosis, Varenicline, Adverse cardiovascular effect, α_7 nAChR, Scavenger receptor

【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治療法として最も経済的かつ効果的な方法である [1]。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 α_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 [2,3,4]。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 [5,6]。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 [7,8]。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などを考慮すれば、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 [9,10,11]。

そこで、本研究では、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実験証拠を提示する。

第1章 バレニクリンによる心血管イベント発症機序

(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) マウスを用いて実験を行った。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) 及び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週齢時に大動脈を摘出し動脈硬化巣を評価した。

大動脈標本の灰色部位は動脈硬化巣を示す (Fig. 1A)。高用量バレニクリン投与群では、動脈硬化巣面積 ($8.3 \pm 3.4\%$) が、vehicle群 ($5.4 \pm 2.0\%$) 及び低用量バレニクリン群 ($4.7 \pm 1.0\%$) のそれと比較して有意に増加した。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、コントロール群及び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)。

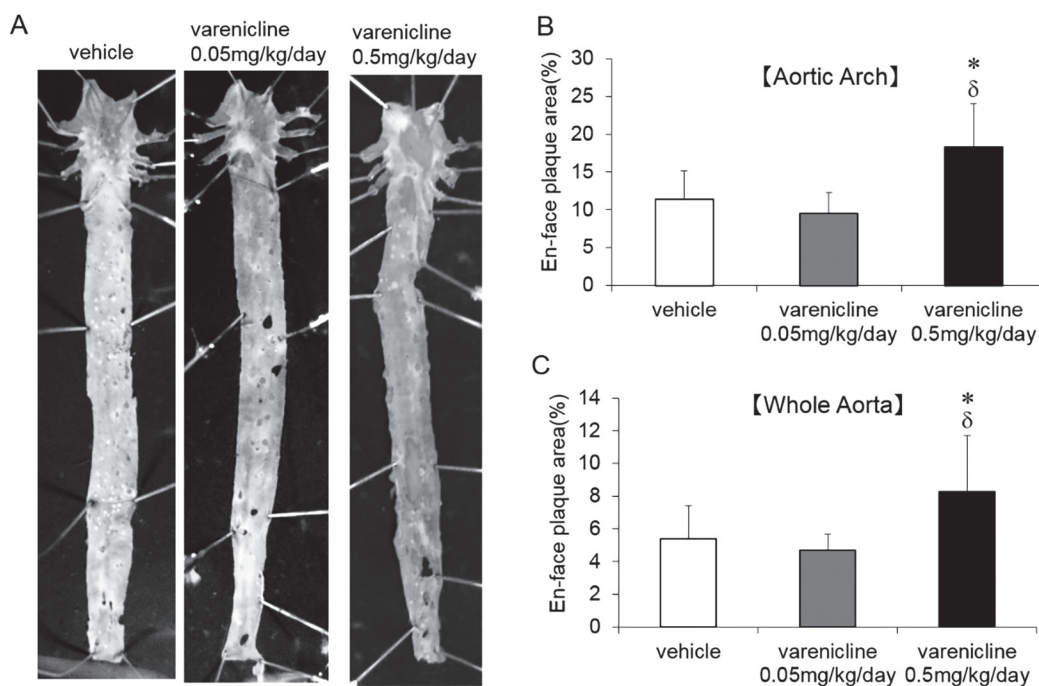


Fig.1 Atherosclerotic plaques in the aorta of varenicline-treated ApoE KO mice. (A) Representative *en face* photographs of the aorta showing oil red O-stained atherosclerotic plaques. Quantitative measurement of *en face* plaque area (%) in the aortic arch (B) and whole aorta (C). Each bar indicates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

(2) α_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 α_7 nAChRに対する50%有効量は、 $\alpha_4\beta_2$ nAChRのそれと比較して約8倍高い用量であるが、 α_7 nAChRに対しては完全作動薬として効果的に働く。 α_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。従って、バレニクリンが α_7 nAChRを介して動脈硬化巣形成を促進する可能性が考えられる。そこで、(1)と同様のプロトコルで α_7 nAChR拮抗薬 MLA (5 mg/kg/day) とバレニクリン (0.5 mg/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、大動脈弓の動脈硬化巣形成が有意に促進された (Fig.2)。この動脈硬化巣増大作用は、MLAを併用することにより有意に抑制された (Fig.2)。さらに、大動脈起始部においても、バレニクリンは動脈硬化巣の形成を有意に促進し、この促進効果はMLAにより抑制された (Fig.3)。以上、動脈硬化モデルマウスにおいて、バレニクリンは α_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) 体重及び血中コレステロール値に対するバレニクリンの影響

バレニクリン及びMLA単独投与では、体重及び総コレステロール値に影響はなかった (Table.1)。従って、バレニクリンは、体内脂肪及びコレステロール値を変動させることなく動脈硬化巣形成を促進させることが示唆された。

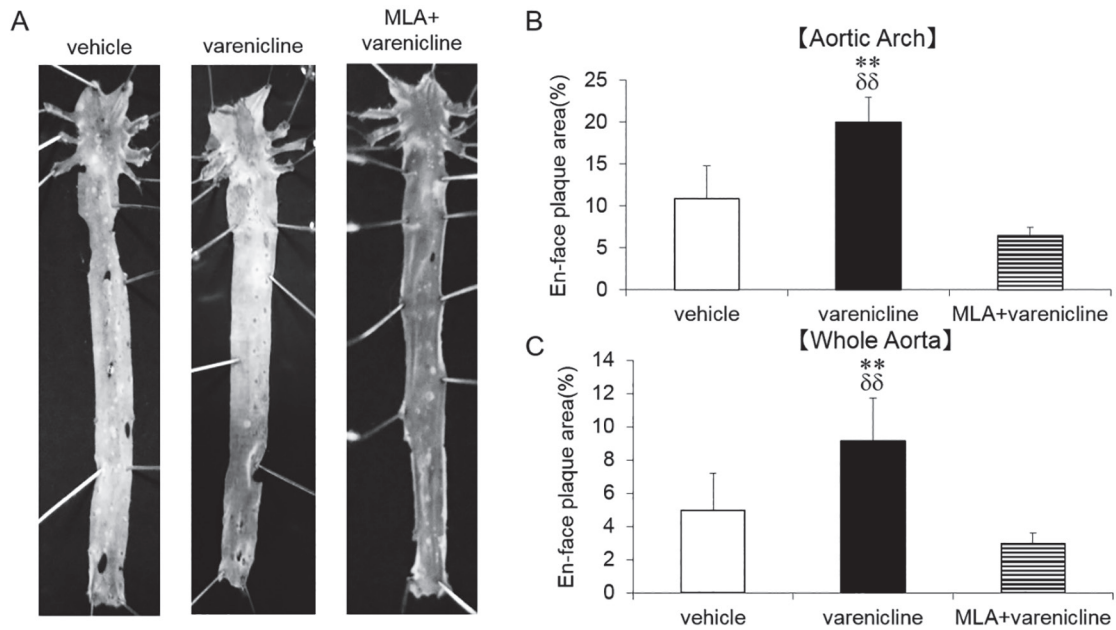


Fig.2 Atherosclerotic plaques in the aorta of varenicline- and varenicline plus MLA-treated ApoE KO mice. (A) Representative *en face* photographs of the aorta showing oil red O-stained atherosclerotic plaques from vehicle, varenicline, and varenicline + MLA-treated ApoE KO mice. Pooled data showing 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.

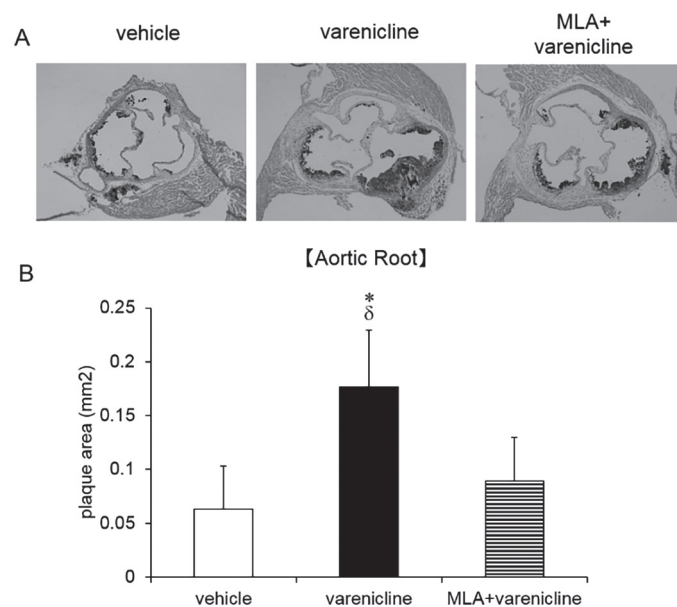


Fig.3 Atherosclerotic plaques in the aorta of varenicline- and varenicline plus MLA-treated ApoE KO mice. (A) Representative cross-sections of oil red O-stained plaques in the aortic root. (B) Pooled data of plaque area in the aortic root. Each bar indicates mean \pm S.D. (n=9-10) * $P < 0.05$ vs vehicle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

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

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

第2章 マクロファージにおけるバレニクリンの作用

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。第2章では, このマクロファージ機能に対するバレニクリンの作用について検討した。

(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 RAW 264.7 にバレニクリンを濃度依存的に負荷し, スカベンジャー受容体 (LOX-1, CD36, SR-A) のタンパク質発現量を比較検討した。RAW 264.7 細胞において, バレニクリンは濃度依存的に LOX-1 及び CD36 発現量を増加させた (Fig.4)。しかし, SR-A タンパク質発現には変化が認められなかった。バレニクリン 10 μ M が LOX-1 及び CD36 発現量を最も増加させたため, バレニクリンの負荷濃度を 10 μ M と決定し, 以下の実験を行った。

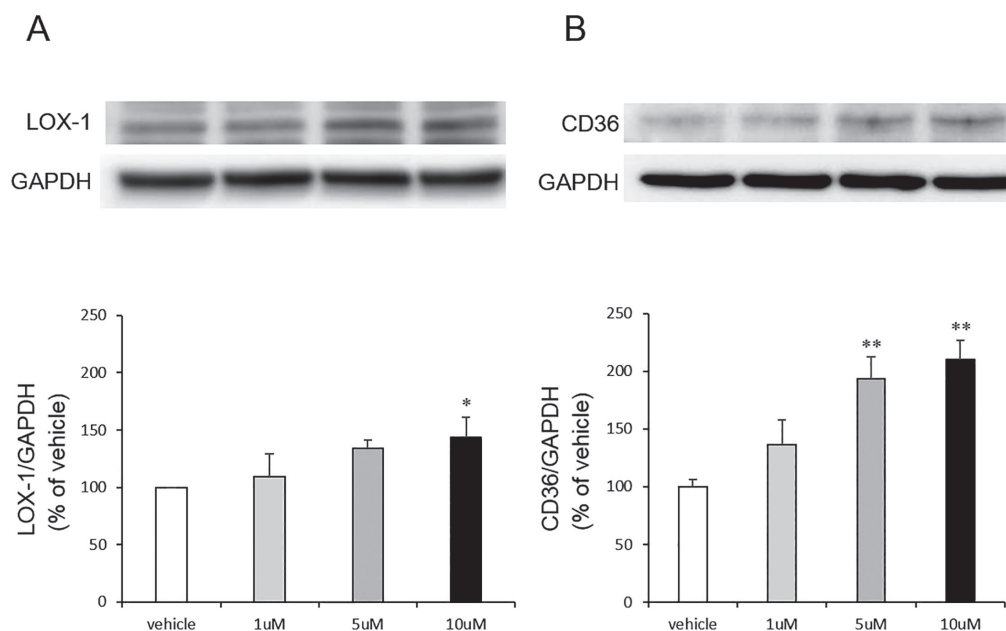


Fig.4 Effect of varenicline on expression of LOX-1 and CD36 in RAW 264.7 cells.

(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 μ 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.

マウス腹腔マクロファージにバレニクリンを処理し、oxLDL取り込み実験を行った。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陽性細胞数を測定した。oil red-O陽性細胞数は、vehicle群では12%であったが、バレニクリン処理群では21%と有意に増加した。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)。

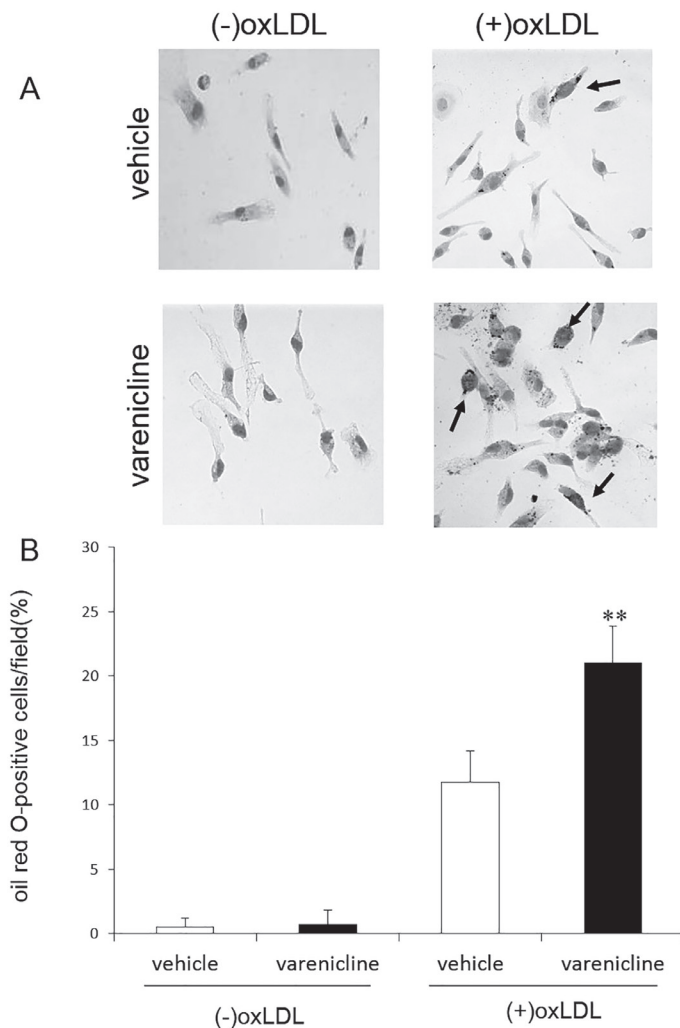


Fig.5 (A) Representative photographs showing macrophages stained with oil red O and hematoxylin in the absence (-) and presence (+) of oxLDL (80 μ g/mL) for 24 h (left and right panel, respectively). Peritoneal macrophages were treated with vehicle or varenicline (10 μ M) for 24 h (upper and bottom panel, 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) α_7 nAChRを介したバレニクリンによるoxLDL取り込み及びLOX-1, CD36発現

前章でバレニクリンは α_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、バレニクリンによるマクロファージのoxLDL取り込み促進作用における α_7 nAChRの関与について検討した。RAW264.7細胞を α_7 nAChR拮抗薬 (MLA) 及び $\alpha_4\beta_2$ nAChR拮抗薬 (DH β E) でそれぞれ30分間、前処置した。その後、バレニクリンを負荷し、LOX-1, CD36発現量及び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及びCD36の発現量増加は、MLAにより有意に抑制された (Fig. 6A, B)。しかし、DH β Eは、これらの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 β Eはこれを抑制しなかった (Fig.7)。

次に、マクロファージの細胞内情報伝達系に対するバレニクリンの作用を検討した。マクロファージのLOX-1及びCD36発現は、ERK1/2 - NF- κ B経路を介することが知られている [12,13,14]。そこで、RAW264.7細胞にバレニクリンを処理し、ERK1/2及びNF- κ Bリン酸化について比較検討を行ったところ、

それぞれのリン酸化は、バレンクリン処理5分後、10分後に有意に促進された (Fig. 8A, B)。一方、ERK1/2及びNF- κ Bは α_7 nAChRを介して活性化されるとの報告がある [15]。RAW264.7細胞に α_7 nAChR拮抗薬 (MLA) 及び $\alpha_4\beta_2$ nAChR拮抗薬 (DH β E) をそれぞれ30分間前処理した。その後、バレンクリンを15分間負荷し、ERK1/2及びNF- κ Bリン酸化について比較検討を行った。バレンクリンによるERK1/2及びNF- κ Bのリン酸化亢進は、MLAにより有意に抑制された (Fig. 9A, B)。しかし、DH β Eは、これらを抑制しなかった (Fig. 9C, D)。

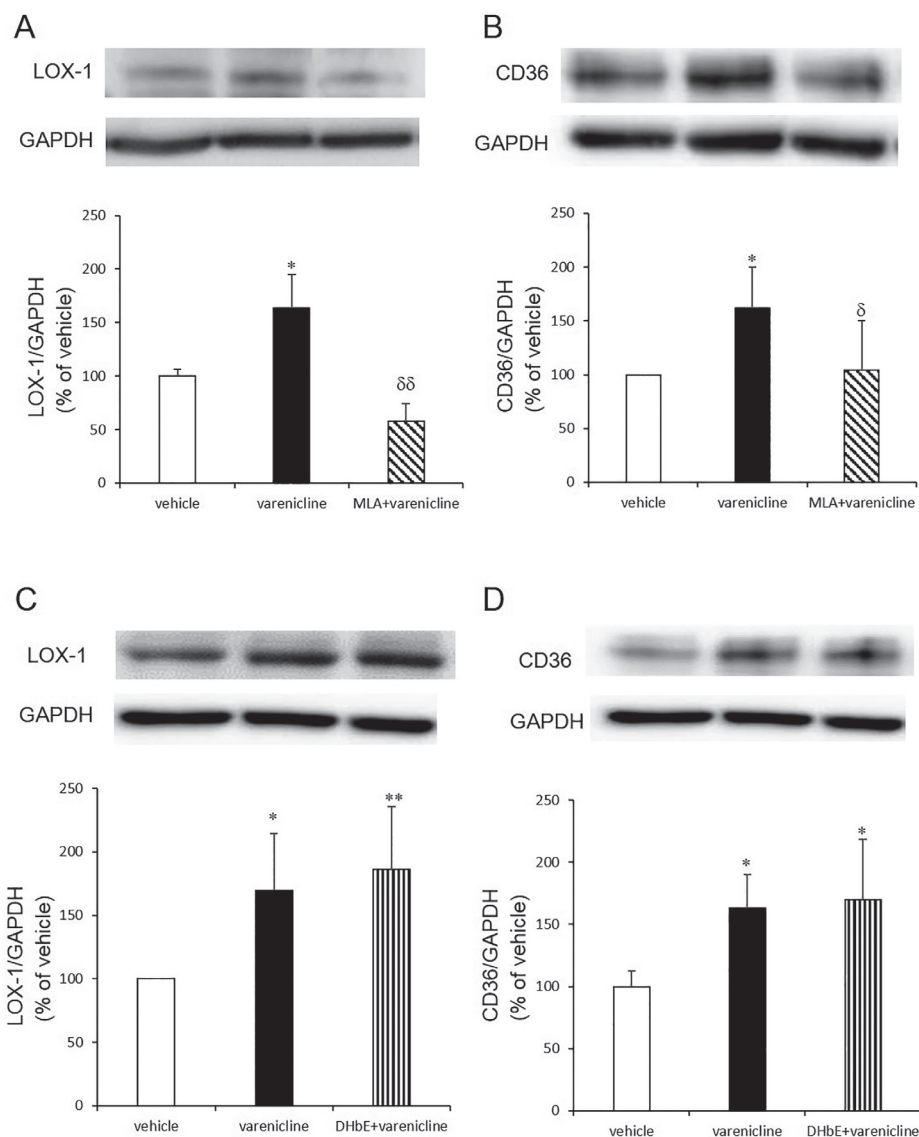


Fig.6 Effect of α_7 (A and B) and $\alpha_4\beta_2$ nAChR (C and D) antagonists on varenicline-increased expression of LOX-1 and CD36 protein (left and right panel, respectively) in RAW 264.7 cells. Cells were treated with vehicle or varenicline (10 μ M) for 24 h in the absence or presence of the α_7 nAChR antagonist MLA (50 nM) or the $\alpha_4\beta_2$ nAChR antagonist DH β E (1 μ M). MLA and DH β 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. δP <0.05, $\delta\delta P$ <0.01: significant difference from varenicline.

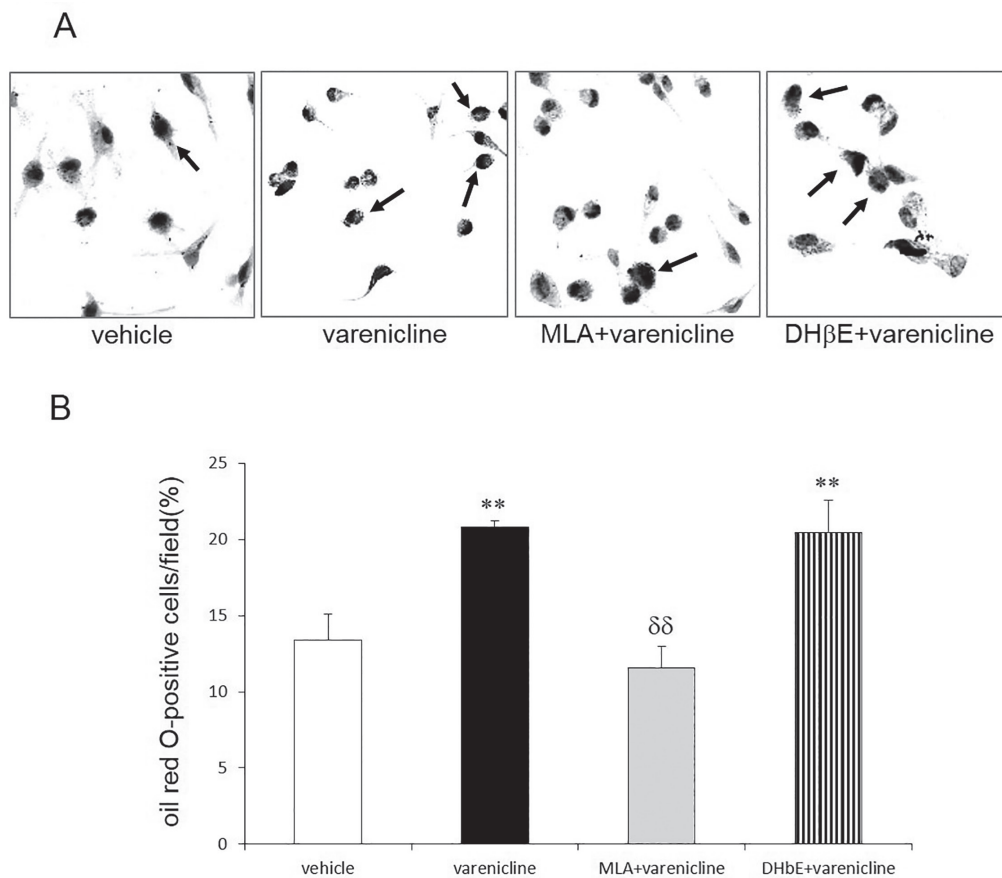


Fig.7 Effect of α_7 and $\alpha_4\beta_2$ nAChR antagonists on varenicline-increased oxLDL uptake in macrophages. (A) Representative photographs showing macrophages stained with oil red O and hematoxylin. Arrowheads show oil red O-positive cells in representative images. (B) Quantitative analyses of oxLDL uptake in macrophages incubated with oxLDL (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Cells were treated with vehicle or varenicline (10 μM) for 24 h in the absence or presence of the α_7 nAChR antagonist MLA (50 nM) or the $\alpha_4\beta_2$ nAChR antagonist DH β E (1 μM). MLA and DH β E 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.

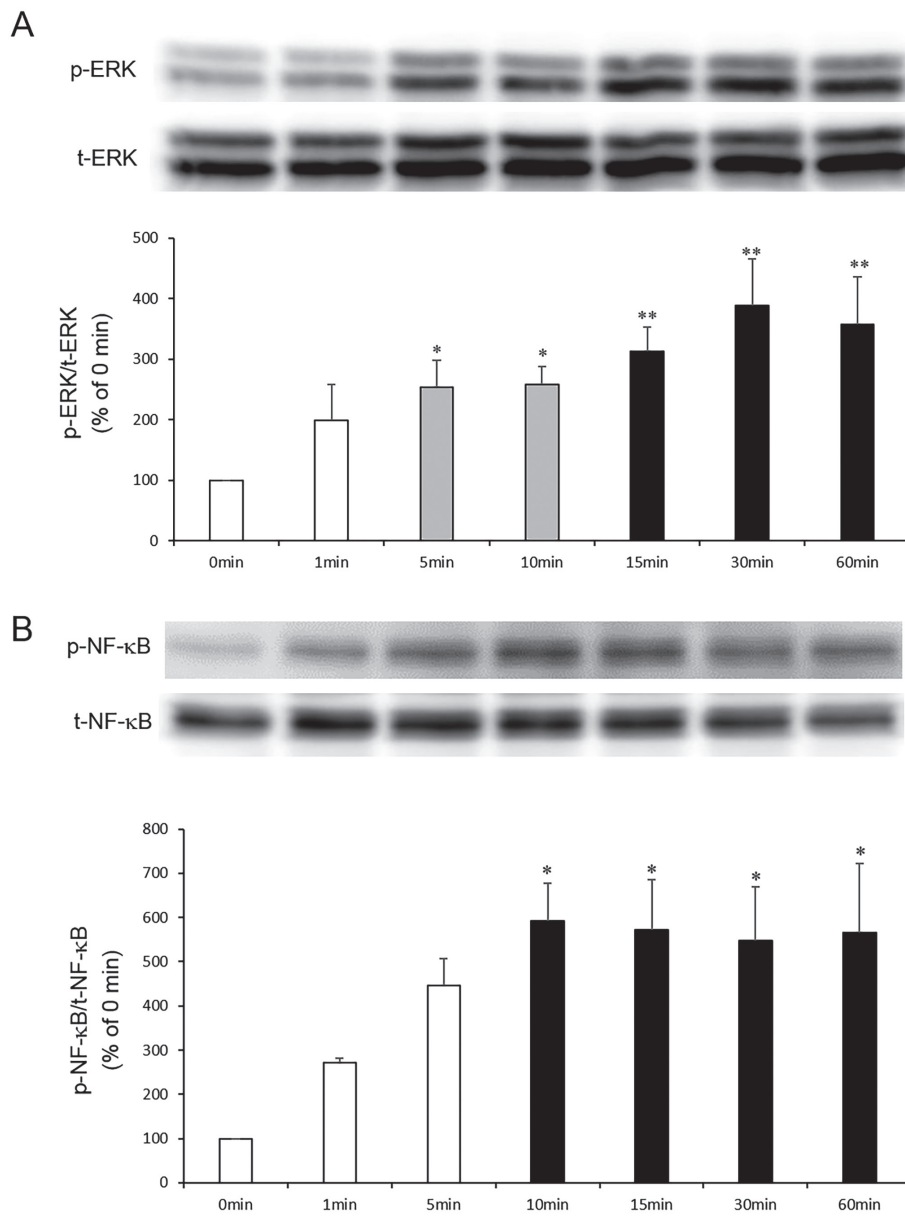


Fig.8 Varenicline-induced phosphorylation of ERK 1/2 (A) and NF- κ B (B) in RAW 264.7 cells. Cells were treated with varenicline (10 μ M) for the indicated times (1, 5, 10, 15, 30 and 60 min). Representative immunoblots (top in each panel) show the protein expression of total and phosphorylated ERK 1/2 and NF- κ B in A and B, respectively. At the bottom of each panel, values are the relative ratio of phosphorylated proteins to total proteins in untreated control cells as a percentage (% of 0 min). Each bar indicates mean \pm S.D (n=3). * P <0.05, ** P <0.01: significant difference from 0 min.

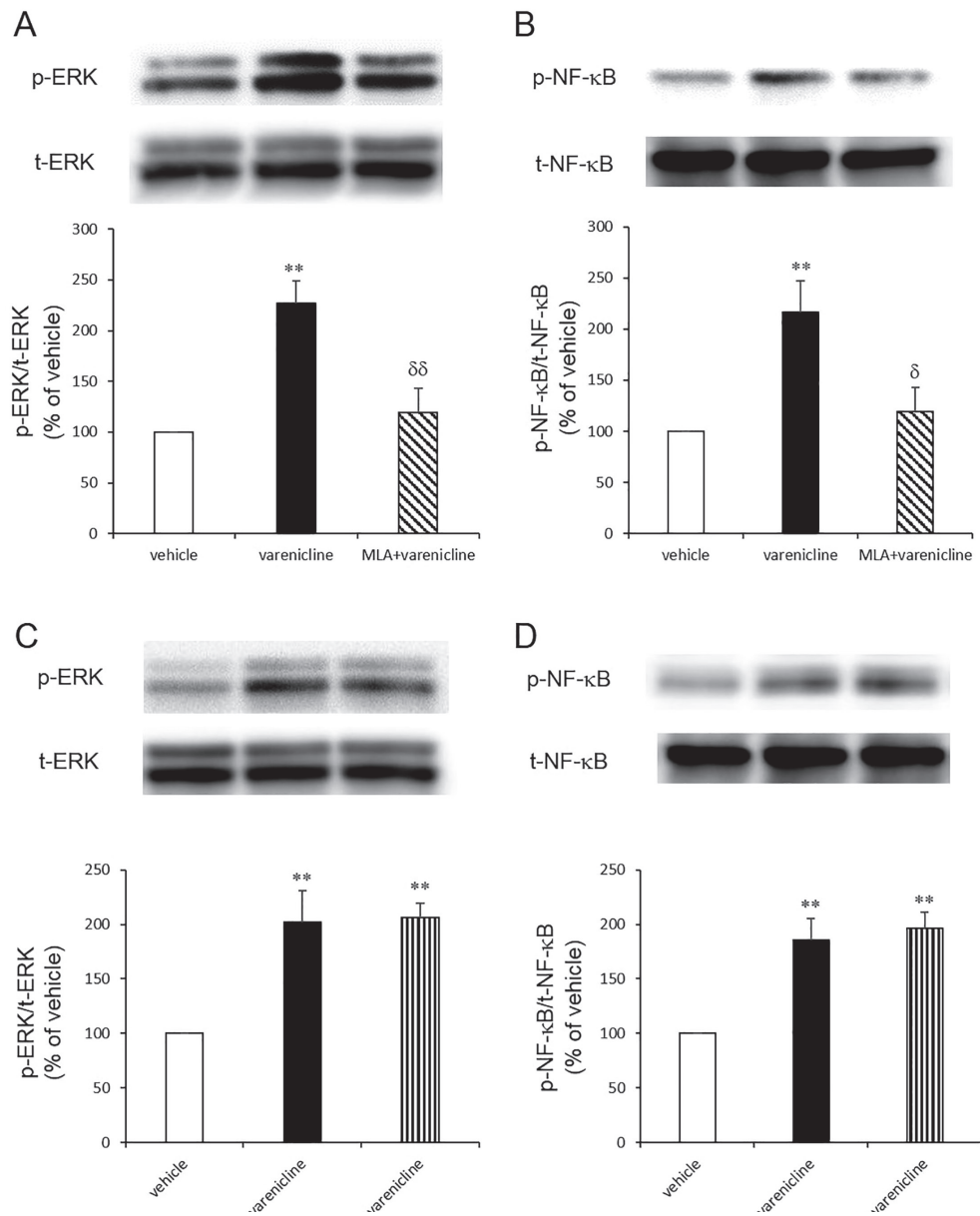


Fig.9 Effect of MLA (α_7 nAChR antagonist) and DH β E ($\alpha_4\beta_2$ nAChR antagonist) on varenicline-induced activation of ERK1/2 and NF- κ B in RAW 264.7 cells. Cells were treated with vehicle or varenicline (10 μ M) for 30 min in the absence or presence of MLA (50 nM) (A and B) or DH β E (1 μ M) (C and D). MLA and DH β E were added to cells at 30 min before treatment with the vehicle or varenicline. Representative immunoblots (top in each panel) show the protein expression of total and phosphorylated ERK1/2 (left) and NF- κ B (right) in RAW264.7 cells. At the bottom of each panel, values are the relative ratio of phosphorylated proteins to total proteins in vehicle-treated cells as a percentage (% of vehicle). Each bar indicates mean \pm S.D (n=3-6). * P <0.05, ** P <0.01: significant difference from vehicle; δP <0.05, $\delta\delta P$ <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(0.5 mg/kg/day)のバレニクリン投与により、動脈硬化巣の形成を有意に促進した。また α_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 α_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 α_7 nAChRを介して、ERK1/2 - NF- κ B経路を活性化させ、LOX-1及び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。

【参考文献】

- [1] N.R. Anthonisen *et al.* The Effects of a Smoking Cessation Intervention on 14.5-Year Mortality A Randomized Clinical Trial. *Ann Intern Med.* **142** (2005) 233-239.
- [2] K.B. Mihalak *et al.* Varenicline is a partial agonist at $\alpha_4\beta_2$ and a full agonist at α_7 neuronal nicotinic receptors, *Mol Pharmacol* **70** (2006) 801-805.
- [3] M. Nakamura *et al.* Efficacy and tolerability of varenicline, an $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, in a 12-week, randomized, placebo-controlled, dose-response study with 40-week follow-up for smoking cessation in Japanese smokers, *Clin Ther* **29** (2007) 1040-1056.
- [4] D. Gonzales *et al.* Varenicline, an $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial, *Jama* **296** (2006) 47-55.
- [5] D.E. Jorenby *et al.* Efficacy of varenicline, an $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial, *Jama* **296** (2006) 56-63.
- [6] C. Oncken *et al.* Efficacy and safety of the novel selective nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, varenicline, for smoking cessation. *Arch Intern Med* **166** (2006) 1571-1577.
- [7] J.T. Hays *et al.* Efficacy and safety of varenicline for smoking cessation, *Am J Med* **121** (2008) S32-42.
- [8] S. Singh *et al.* Risk of serious adverse cardiovascular events associated with varenicline: a systematic review and meta-analysis, *CMAJ* **183** (2011) 1359-1366.
- [9] N.A. Rigotti *et al.* Efficacy and safety of varenicline for smoking cessation in patients with cardiovascular disease: a randomized trial, *Circulation* **121** (2010) 221-229.
- [10] J.J. Prochaska *et al.* Risk of cardiovascular serious adverse events associated with varenicline use for tobacco cessation: systematic review and meta-analysis, *BMJ* **344** (2012) e2856.
- [11] H. Svanstrom *et al.* Use of varenicline for smoking cessation and risk of serious cardiovascular events: nationwide cohort study, *BMJ* **345** (2012) e7176.

- [12] D. Liang *et al.* Porphyromonas gingivalis infected macrophages upregulate CD36 expression via ERK/NF-kappaB pathway, *Cell Signal* **28** (2016) 1292-1303 .
- [13] W. Zhao *et al.* Lipopolysaccharide induced LOX-1 expression via TLR4/MyD88/ROS activated p38MAPK-NF-kappaB pathway, *Vascul Pharmacol* **63** (2014) 162-172 .
- [14] E. Hossain *et al.* Lipopolysaccharide augments the uptake of oxidized LDL by up-regulating lectin-like oxidized LDL receptor-1 in macrophages, *Mol Cell Biochem* **400** (2015) 29-40 .
- [15] A. Chernyavsky *et al.* Upregulation of nuclear factor-kappaB expression by SLURP-1 is mediated by alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and involves both ionic events and activation of protein kinases, *Am J Physiol Cell Physiol* **299** (2010) C903-911 .