

バレニクリンによる $\alpha 7$ ニコチン受容体を介した 慢性閉塞性肺疾患の治療効果

バレニクリン新規作用研究チーム（課題番号：167111）

研究期間：平成28年7月27日～平成31年3月31日

研究代表者：古賀允久

研究員：道具伸也、高田美友子

【研究成果】

＜背景および目的＞

慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease; COPD）は、慢性的な気道の炎症や肺胞壁の破壊を特徴とする肺の炎症性疾患である。末梢気道病変と気腫性病変が複合的に作用することで気流閉塞が生じ、これにより労作時の呼吸困難や慢性の咳、痰が主な症状としてあらわれる。さらに、COPDは肺だけでなく全身性炎症や心・血管疾患、骨粗鬆症、糖尿病、消化器疾患などを併発する。現在、我が国におけるCOPDによる死亡者数は、年間約15,000人であり（H28厚生労働省人口動態統計）、2001年に実施されたNICEスタディ（Nippon COPD Epidemiological Study）によると高齢者になるほどCOPDの有病率が高く（Fukuchi Y et al., 2004, GOLD日本委員会）、高齢化に伴いCOPDの患者数は増加すると考えられている。このようなCOPDの発症には様々な外的要因・内的要因が関わっており、その最大の危険因子はタバコ煙の吸入曝露である。タバコ煙などの刺激物は、気道のマクロファージを活性化させることで、インターロイキン（IL）-8およびロイコトリエン（LT）B4などの好中球走化性因子を放出し、好中球エラスターゼやカテプシンなどのプロテアーゼを放出させる（Barnes PJ, 2004）。これにより、肺実質における結合組織の分解や粘液分泌の刺激が起これ、肺気腫や慢性気管支炎を惹き起こす。COPDにおける肺胞壁の破壊は不可逆的であるため、根治療法がなく進行性の疾患である。そこでCOPDの最大の危険因子はタバコであるため、根治療法のない現段階ではCOPDの発症予防・進行抑制には禁煙が最も効果的で経済的な方法とされている。

そのため、禁煙補助薬バレニクリンによる禁煙治療が

近年増加している。バレニクリンは主に $\alpha 4 \beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）部分作動薬として作用し、また $\alpha 7$ nAChR 完全作動薬としても作用する。従来の禁煙療法であるニコチン代替療法と異なり、バレニクリンは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筋梗塞、脳卒中などの循環器疾患および脳血管障害の患者にも使用可能である。また、バレニクリンによる禁煙療法における1年後の禁煙効果はニコチン代替療法よりも1.3倍高く、禁煙成功率が高い（Cahill K et al., 2008）。さらに、バレニクリンを用いた12週間の禁煙療法によって禁煙に成功した人では、スパイロメトリーの肺年齢が改善するとの報告がある（Iwaoka M et al., 2016）。このように本薬物は禁煙成功率が高く、一部の心疾患患者および脳血管障害の患者にも使用可能であることから、画期的で有効性・安全性も高い薬とされている。

osteopontin（OPN）はマクロファージ、活性T細胞、上皮細胞、および平滑筋細胞において炎症過程で増加する骨基質タンパク質であり、炎症部においてマクロファージ、T細胞を活性化せる。増悪したCOPD患者において血清OPNが増加し（Lee SJ et al., 2014）、また、喀痰中、肺組織においてもOPNの発現が増加するという報告がある（Schneider DJ et al., 2010）。

そこでCOPDにおけるバレニクリンの効果を検討し、COPDに対するバレニクリンの新規効果を追究することを目的とした。具体的には、COPDモデルマウスにバレニクリンを投与し、肺組織を組織学的に評価した。さらに、炎症性細胞である肺胞マクロファージを培養し、バレニクリンの効果をOPN発現により検討した。

<方法>

(1) COPD モデルマウスの作成：我々が既に報告した方法で C57BL/6 マウスに Porcine Pancreatic Elastase (PPE) を 2 U 気管支内噴霧し、COPD モデルマウスを作成した (Takata F et al., J Pharmacol Sci ; 2015)。作成したモデルマウスに Figure 1 のスケジュールでバレンクリン (0.5mg/kg/day) および $\alpha 7$ nAChR アンタゴニストである methyllycaconitine (MLA : 5 mg/kg/day) をそれぞれ皮下投与、腹腔内投与し、バレンクリンによる効果を評価した。まず作成した COPD モデルマウスにおけるバレンクリンの効果を評価した (Figure 1 A)。次に、バレンクリンによるその機序を明らかにするために、MLA を併用し、その効果を検討した (Figure 1 B)。また、COPD 発症初期におけるバレンクリンの効果を肺組織および気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) で検討した (Figure 1 C)。具体的には、以下の評価を行った。

(2) 肺組織の評価：4 %パラホルムアルデヒドで固定した肺組織を O.C.T.コンパウンドで包埋し、7 mm 厚の凍結切片を作成した。作製した肺組織の切片を H&E 染色し、コンピュータ解析により肺胞径を測定し、比較した。

(3) 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) の評価

2 mL の cold-PBS で 回 収 し た BALF 中の炎症性細胞数を評価するため、BALF をスライドガラスに塗布し、乾燥、メタノール固定後にマクロファージ、好中球および T 細胞をそれぞれ F 4 /80 抗体、NIMP-R14 抗体および CD 4 抗体を用いて、蛍光免疫染色を行い、各陽性細胞数により比較、検討した。

(4) 培養肺胞マクロファージにおけるバレンクリンの効果

肺胞マクロファージ (MH-S) を用いて実験を行い、バレンクリン (0, 0.1, 1, 10 μ M) で 24 時間処理し、OPN のタンパク発現を western blot 法で、mRNA 発現を real-time PCR 法より評価した。

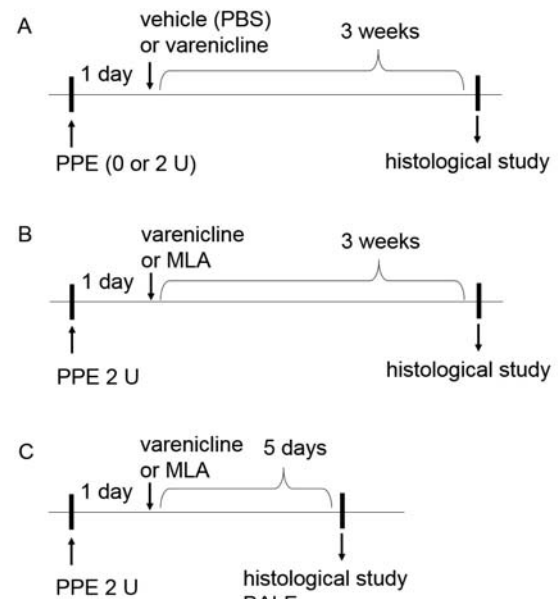


Figure 1 Experimental protocols

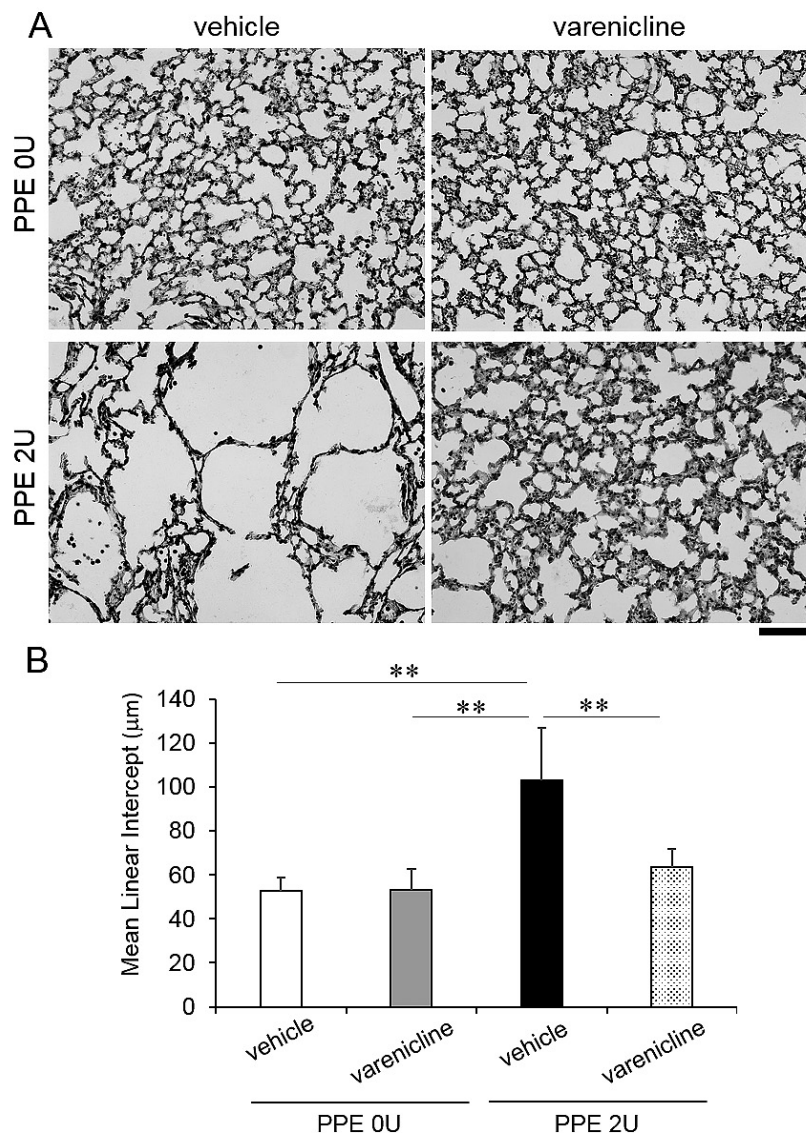


Figure 2 Effect of varenicline treatment for a 21-day period on alveolar expansion in PPE-inhaled mice

<結果>

(1) PPE 誘発肺胞径拡大におけるバレンिकリンの効果 (COPD 進行期)

3週間 vehicle とバレンिकリンの投与を行った COPD モデルマウスの肺組織を摘出し、HE 染色後、各肺組織切片における肺胞径の平均値を測定し、各群間で比較検討した (Figure 1 A)。PPE 2U 群における肺胞径 ($103.08 \pm 23.65 \mu\text{m}$) は、PPE 0U 群 ($52.56 \pm 6.13 \mu\text{m}$) と比較して肺胞径が有意に拡大した ($P < 0.01$) (Figure 2)。PPE 0U 群の vehicle 群とバレンिकリン群では、肺胞径に有意な差はなかった。その一方で、PPE 2U 群において、バレンिकリンは PPE 誘発による肺胞径の拡大を有意に抑制した ($63.48 \pm 8.39 \mu\text{m}$, $P < 0.01$) (Figure 2)。

(2) PPE 誘発肺胞径拡大における $\alpha 7$ nAChR を介したバレンिकリンの効果 (COPD 進行期)

バレンिकリンによる肺胞径の拡大抑制効果が $\alpha 7$ nAChR を介するかを明らかにするために、PPE 2U を噴霧したマウスに vehicle、バレンिकリン、MLA+バレンिकリン併用投与を行い、肺組織を回収・評価した (Figure 1 B)。その結果、バレンिकリンのみを投与した群では vehicle 群と比較して肺胞径の拡大が抑制されたが ($61.41 \pm 10.78 \mu\text{m}$, $P < 0.01$)、MLA を併用した群では、バレンिकリンによる肺胞径の拡大抑制効果が阻害された ($87.29 \pm 27.44 \mu\text{m}$, $P < 0.05$) (Figure 3)。

(3) COPD 発症初期におけるバレンिकリンの効果

COPD 発症初期におけるバレンिकリンの効果を検討するため、PPE 2U 噴霧後1日目より、バレンिकリンおよび MLA を5日間投与し評価した。PPE 2U+vehicle 群 ($86.48 \pm 22.35 \mu\text{m}$) と比較して、PPE 2U+バレンिकリン群 ($65.36 \pm 10.35 \mu\text{m}$) では肺胞径の拡大が有意に抑制した ($P < 0.05$) (Figure 4)。一方、バレンिकリ

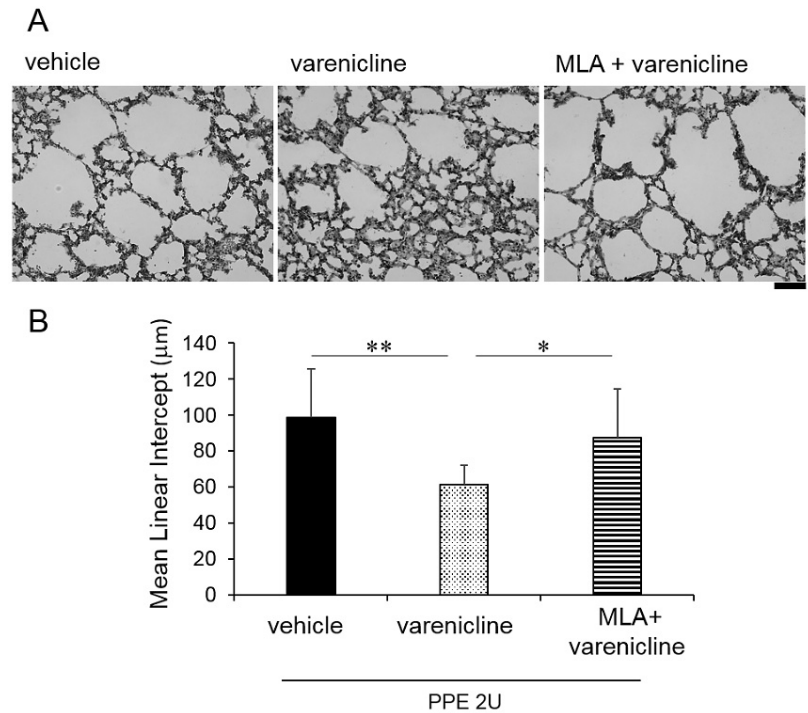


Figure 3 Effect of varenicline and MLA+varenicline treatment for a 21-day period on alveolar expansion in 2 U PPE-inhaled mice.

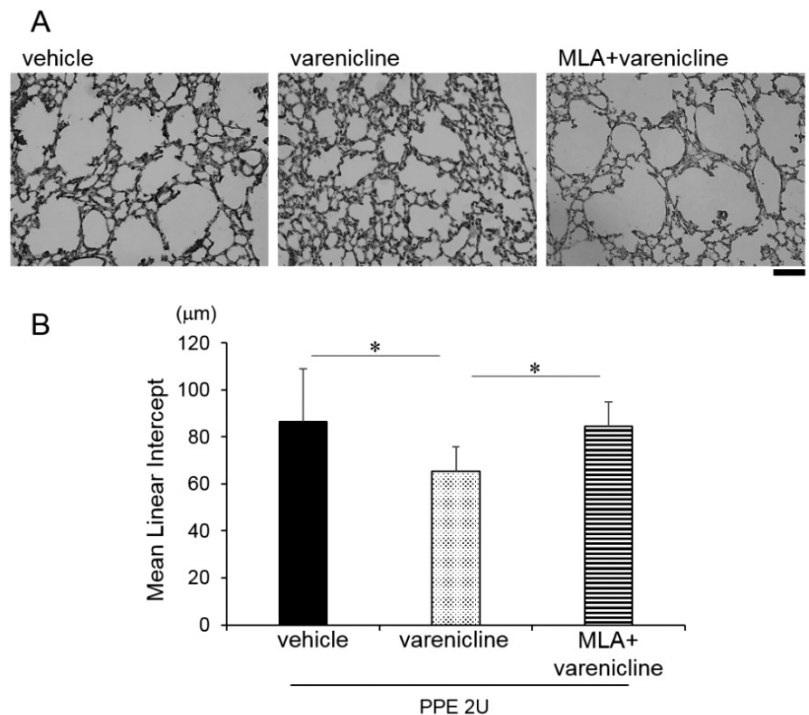


Figure 4 Protective effect of acute varenicline treatment for a 5-day period on alveolar expansion in the early stage of PPE-inhaled mice.

ンによるこの効果は、MLA により、COPD の初期においても明らかに抑制された ($P < 0.05$) (Figure 4)。

次に、BALF 中の炎症性細胞数を蛍光免疫組織染色し、陽性細胞数を比較することで、肺における炎症性細胞に及ぼすバレニクリンの影響を検討した。PPE 2U 噴霧により、BALF 中の炎症性細胞数(総細胞、マクロファージ、好中球および T 細胞)が増加した。

PPE 2U+vehicle 群と比較して、PPE 2U+バレニクリン群において PPE 2U により増加した BALF 中の総細胞数、マクロファージ (F4/80)、好中球 (NIMP-R14) および T 細胞 (CD4) の陽性細胞数は、それぞれ 28%、22%、21%、44% まで減少した ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$) (Figure 5)。さらに、MLA 投与により、バレニクリンによる BALF 中の総細胞数、マクロファージ数、好中球数および T 細胞数を減少させる効果は、阻害された。

(4) 培養肺泡マクロファージ (MH-S) におけるバレニクリンによる OPN 発現に及ぼす影響

MH-S にバレニクリンを 0, 0.1, 1, 10 μM で 24 時間処理し、タンパク質および mRNA の OPN 発現を比較検討した。OPN タンパク質は、バレニクリン濃度依存的に減少した。0 μM と比較して、1 μM のバレニクリン処理で有意に OPN タンパク質発現は減少し ($P < 0.05$)、またバレニクリン 10 μM 処理により、OPN タンパク発現を 50% 減少させ、最も顕著であった ($P < 0.01$) (Figure 6 A)。さらに、同様の条件で OPN mRNA 発現も real-time PCR 法で、比較したところ、タンパク質発現と同様に OPN mRNA 発現は、バレニクリン濃度依存的に減少し、10 μM のバレニクリン処理により、0 μM と比較して最も減少した ($P < 0.01$) (Figure 6 B)。

<考察>

PPE 0U または 2U を噴霧したモデルマウスにおいて、COPD 進行期におけるバレニクリンの効果を検討するため、vehicle およびバレニクリンを 3 週間皮下投与し、肺胞径を比較した (Figure 1 A)。その結果、バレニクリンは PPE 誘発による肺胞径の拡大を有意に抑制した (Figure 2)。バレニクリンには PPE 誘発による肺胞径拡大の抑制効果があることが示唆された。

次に、バレニクリンの PPE 誘発による肺胞径の拡大抑制効果の機序を明らかにするため、バレニクリンが α

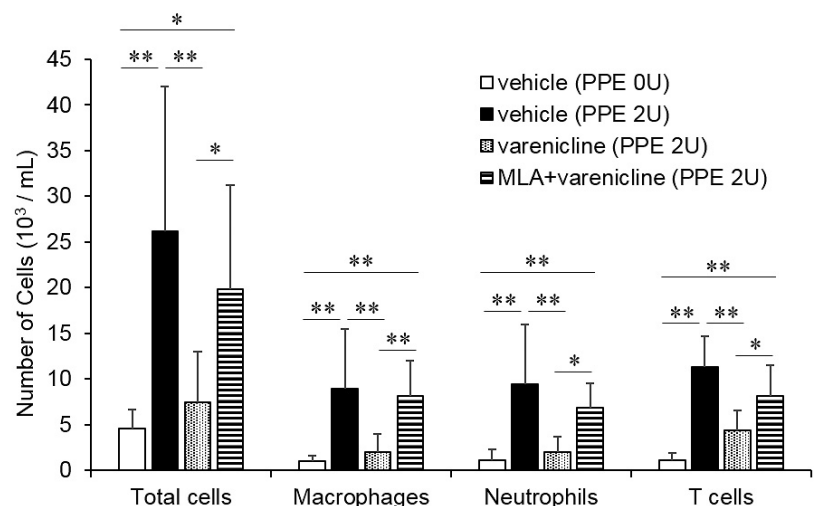


Figure 5 Protective effect of acute varenicline treatment for a 5-day period on inflammatory cells in BALF in the early stage of PPE-inhaled mice.

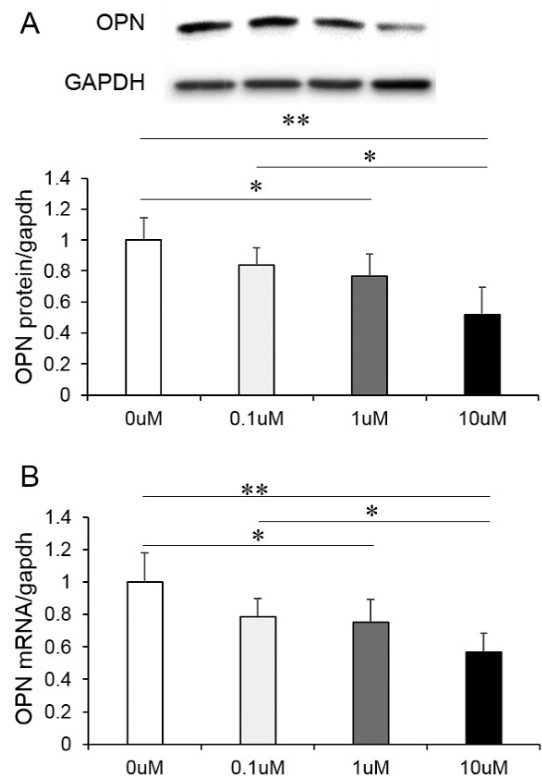


Figure 6 Effect of varenicline treatment for 24h on OPN expression in MH-S

7 nAChR 完全作動薬であることに着目し、 $\alpha 7$ nAChR 拮抗薬である MLA をバレニクリンと併用投与し、肺組織を評価した (Figure 1 B)。その結果、MLA は、バレニクリンによる肺胞径拡大抑制を阻害した (Figure 3)。このことから、バレニクリンの肺胞径拡大抑制効果は $\alpha 7$ nAChR を介すること、また COPD 進行期においてバレニクリンが有用であることが示唆された。

さらに、COPD 発症期におけるバレニクリンの効果を検討するため、同様にモデルを作成し、vehicle、バ

レニクリンおよびバレンिकリン+MLA を5日間投与し、評価した (Figure 1 C)。COPD 発症期と同様に、 $\alpha 7$ nAChR を介したバレンिकリンの効果により、PPE による肺胞径拡大を抑制することが示唆された (Figure 4)。

COPD の発症・増悪には、肺へのマクロファージ、好中球および T 細胞などの炎症性細胞の浸潤が関与している (Hautamaki RD et al. 1997)。そこで、バレンिकリンによる BALF 中の炎症性細胞における効果を検討した。PPE 2 U 噴霧による BALF 中の炎症性細胞の増加は、バレンिकリンにより減少し、一方 MLA によりバレンिकリンによるその効果は抑制された。よって、バレンिकリンの $\alpha 7$ nAChR を介した効果は、肺への炎症性細胞 (マクロファージ、好中球および T 細胞) の浸潤を抑制することにより、COPD の発症・増悪に有用であるかもしれない。また肺組織においてバレンिकリンが作用する $\alpha 4$ 、 $\beta 2$ 、 $\alpha 7$ nAChR が発現しているため、バレンिकリンが肺に直接作用する可能性も考えられる。

次に、培養肺胞マクロファージにおけるバレンिकリンの効果 COPD 増悪に関与する OPN 発現に着目し、検討した。バレンिकリンは、肺胞マクロファージにおける OPN 発現を濃度依存的に減少させたことから、バレンिकリンによる OPN 発現減少により肺を保護したのかもしれない。しかし、この発現減少における $\alpha 7$ nAChR の関与は不明であるため、今後検討が必要である。

本研究では、マクロファージにおける OPN 発現に着目し、バレンिकリンの効果を検討したが、好中球、T 細胞などの炎症性細胞におけるバレンिकリンの効果の検討も今後必要である。さらに、OPN だけでなく、他の増悪因子、抑制因子に及ぼす影響への検討も今後の課題である。

本研究成績は、バレンिकリンは、禁煙補助薬としてだけでなく、COPD および肺気腫に対して、有効であることが示唆された。さらに、BALF 中の炎症性細胞の浸潤をバレンिकリンが抑制したことから、様々な炎症性疾患に対しても効果が期待できるかもしれない。

以上、本研究は $\alpha 7$ nAChR を介したバレンिकリンが COPD の治療に有効であることを示唆し、 $\alpha 7$ nAChR および OPN を標的とした COPD 治療の可能性を提示した点で意義深い。今後、さらなる研究により、バレンिकリンの安全性の向上や COPD 患者さらには炎症性疾患に対する新規治療薬の開発に繋がるかもしれない。

<研究業績>

論文

- 1) Activation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor upregulates blood-brain barrier function through increased claudin-5 and occludin expression in rat

brain endothelial cells. Kimura I, Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Kawahara Y, Nishihira M, Sakada S, Saisho T, Yamauchi A, Kataoka Y. *Neurosci Lett*. 2019 Feb 16; 694: 9-13.

- 2) Varenicline is a smoking cessation drug that blocks alveolar expansion in mice intratracheally administered porcine pancreatic elastase. Mitsuhisa KOGA, Yuki KANAOKA, Tetsushi TASHIRO, Nagisa HASHIDUME, Yasufumi KATAOKA, Atsushi Yamauchi. *J Pharmacol Sci*. 137 (2), 224-229 (2018)
- 3) Varenicline promotes endothelial cell migration by lowering vascular endothelial-cadherin levels via the activated $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mitogen activated protein kinase axis. Mitsuhisa KOGA, Yuki KANAOKA, Keita SUGIYAMA, Kaoru OHISHI, Yuka EJIMA, Mami HISANAGA, Yasufumi KATAOKA, Atsushi YAMAUCHI. *Toxicology*, 390, 1-9 (2017)
- 4) Varenicline enhances oxidized LDL uptake by increasing expression of LOX-1 and CD36 scavenger receptors through $\alpha(7)$ nAChR in macrophages. Yuki KANAOKA, Mitsuhisa KOGA, Keita SUGIYAMA, Kaoru OHISHI, Yasufumi KATAOKA, Atsushi YAMAUCHI. *Toxicology*, 380, 62-71 (2017)

学会発表

- 1) バレンिकリンは、 $\alpha 7$ nAChR を介して肺胞マクロファージにおける osteopontin の発現を減少させる 古賀 允久、稲田 紘舜、田村 茉由、萩原 理子、森園 好江、片岡 泰文、山内 淳史。第92回日本薬理学会年会 2019年 3月 大阪
- 2) 血液脳関門への加熱式タバコ抽出物の影響の検討 木村 郁哉、道具 伸也、高田 美友子、松本 純一、力武 真衣、縄田 理永、江口 夏海、山内 淳史、片岡 泰文 第71回日本薬理学会西南部会 2018年11月 福岡
- 3) 禁煙補助薬バレンिकリンによるマクロファージの oxLDL 取り込み促進作用 古賀 允久、金岡 祐輝、岡本 真奈、中尾 有希、稲田 紘舜、片岡 泰文、山内 淳史 *生体機能と創薬シンポジウム2018* 2018年 8月 福岡稲田 紘舜、古賀 允久、江藤 麻衣、片岡 泰文、山内 淳史 *生体機能と創薬シンポジウム2018* 2018年 8月 福岡
- 4) $\alpha 7$ nAChR 作動薬による TNF- α 誘発性血液脳関門機能障害の修復作用機序 西平 恵、道具 伸也、高田 美友子、木村 郁哉、山内 淳史、片岡 泰文 *生体機能と創薬シンポジウム2018* 2018年 8月 福岡
- 5) Smoking cessation drug, varenicline, inhibited alveo-

lar expansion in mice intratracheally administrated porcine pancreatic elastase. Mitsuhsa Koga, Yuki Kanaoka, Nozomi Kobayashi, Kosyun Inada, Mai Eto, Aya Takagi, Yasufumi Kataoka, Atsushi Yamauchi. *18th World Congress of basic and clinical pharmacology* July, 2018. Kyoto

- 6) Effect of the heat-not-burn tobacco-extracted substances on the brain endothelial barrier function in vitro

Ikuya Kimura, Shinya Dohgu, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Mai Rikitake, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka. *18th World congress of basic and clinical pharmacology* July, 2018. Kyoto

- 7) バレニクリンは $\alpha 7$ nAChR を介してヒト臍帯静脈内皮細胞の VE-カドヘリンを減少させ、遊走を促進させる 古賀允久、金岡祐輝、橋爪渚、田代哲士、片岡泰文、山内淳史 第90回日本薬理学会年会 2017年3月長崎

- 8) バレニクリンは $\alpha 7$ nAChR を介して LOX-1 及び CD36発現を増加させマクロファージの酸化 LDL 取り込みを促進させる 金岡祐輝、古賀允久、片岡泰文、山内淳史 第90回日本薬理学会年会 2017年3月長崎

- 9) 脳微小血管内皮細胞の $\alpha 7$ nAChR 活性化は、TNF- α 刺激による密着結合蛋白質及び障壁能の低下を抑制する

木村郁哉、道具伸也、高田美友子、松本純一、川原庸平、西平恵、坂田昇平、最所拓也、片岡泰文、山内淳史 第90回日本薬理学会年会 2017年3月長崎

- 10) ニコチン受容体サブタイプ $\alpha 7$ nAChR による血液脳関門障壁能の制御

木村郁哉、道具伸也、高田美友子、松本純一、川原庸平、西平恵、坂田昇平、最所拓也、山内淳史、片岡泰文 第69回日本薬理学会西南部会 2016年11月 松山

<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：167111)