

頭部外傷後の脳および急性肺傷害におけるバレニクリンの効果

研究チーム：バレニクリン頭部外傷治療

研究期間：令和元年7月24日～令和4年3月31日

研究代表者：古賀允久

研究員：高田美友子、松本純一

【研究成果】

< 背景 >

交通事故や転倒・転落などによる外傷性脳損傷 (Traumatic Brain Injury: TBI) の受傷者は、本邦では年間 28 万人、世界的には年間 1000 万人にもものぼる (Maas et al., 2008 Lancet Neuronal)。TBI は脳神経細胞の脱落や脳内炎症に関わるグリア細胞活性化を惹起するため、神経機能不調を呈する脳疾患発症 (てんかんや脳神経変性疾患など) の危険因子である。しかし TBI 後の神経障害を予防・改善するための方法は未だ確立されていない。さらに TBI は急性肺傷害の合併症を引き起こしやすい (Zygun et al., 2005 Crit Care Med)。頭部外傷を受傷した脳から放出される high-mobility group box protein 1 (HMGB1) などの炎症性メディエーターは肺機能を低下させる (Weber et al. 2014 Sci Transl Med)。また TBI を受傷することで大脳皮質・海馬における $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) の発現量が減少し、ニコチンを慢性的に投与することで TBI によって減少した $\alpha 7$ nAChR の発現量が回復したという報告がある (Verbois et al., 2010 J Neurotrauma)。

一方、禁煙補助薬バレニクリンは $\alpha 4\beta 2$ nAChR 部分作動薬及び $\alpha 7$ nAChR 完全作動薬であり、従来のニコチン代替療法よりも禁煙成功率が高く画期的な薬である。我々は、バレニクリンが、 $\alpha 7$ nAChR を介してブタ腭エラストラーゼ (PPE) 誘発による肺胞径拡大を伴う肺傷害を抑制したことから、本医薬品が肺保護作用を有する可能性を指摘した (Koga et al. 2018 J Pharmacol Sci)。

このように、TBI 後の脳組織において $\alpha 7$ nAChR が減少すること、TBI 後に急性肺傷害が惹起しやすいこと、バレニクリンが $\alpha 7$ nAChR を介して PPE 誘発の肺傷害を抑制することを総合すると、TBI による脳障害及び

急性肺傷害において、 $\alpha 7$ nAChR が共通して関与することが考えられる。そこで仮説「 $\alpha 7$ nAChR 完全作動薬であるバレニクリンが TBI 後の脳障害の重症化及び急性肺傷害の発症・増悪を抑制する。」を検証した。すなわち、頭部外傷モデルマウス、神経細胞、肺胞マクロファージを用いてバレニクリンによる神経保護作用及び肺保護作用を評価した。

< 方法 >

1. 頭部外傷モデルマウス

体重 18-23 g の雄性 C57BL/6J (6～8 週齢) を実験に用い、水と飼料を自由摂取環境下で、室温 23～25°C で飼育した。

イソフルラン (2.5%) 吸入麻酔後、吸入器で持続的な麻酔下 (1.5%) で Controlled Cortical Impact (CCI) 装置を用いて頭部外傷モデルマウスを作製した (Sakai et al. 2021, J Pharmacol Sci)。頭蓋骨の骨頂・側頭葉部 (-2.5mm bregma and 2.75mm lateral) に 4 mm 程度の穴をあけ、CCI 装置で施術部位に外傷を与えた。CCI 条件は直径 3 mm の先端が平らな金属棒を用いて、速度：3.0m/s、深さ：0.5mm、衝撃持続時間：120ms で行った。対照群として、頭蓋骨剥離処置のみを行ったマウス群を sham、頭蓋骨剥離処置に加え、CCI 負荷を与えたマウス群を CCI とした。

頭蓋骨剥離処置及び CCI 装置による負荷処置の実施日を Day 0 として、その前日から Day 3 までの 5 日間で 1 日 1 回バレニクリン (1 mg/kg/day) を皮下投与した。バレニクリンに対する対照群については vehicle として saline を同様に投与した。

2. 脳におけるバレニクリンの効果

2-1. 頭部外傷の評価

Neurological Severity Score (NSS)

頭部外傷の重症度は Neurological Severity Score (NSS) を用いて評価した。TBI 後のマウスにおける運動機能と一部の認知機能を評価するために、NSS を用いて CCI により形成された頭部外傷の重症度に関する評価を行った。NSS は核磁気共鳴画像及び組織学的検査を使用して得られたデータと高度に相関し、脳組織の損傷を反映する。NSS の測定は CCI 負荷後 1 時間経過してから行った。NSS の各評価項目を以下に示す (Table 1)。左脳に CCI 負荷を与えると右足に麻痺が現れ、運動機能に障害が生じる。また、CCI の負荷による重症度が高くなることで障害が大きくなり、その増大に相関して NSS の値も大きくなる。NSS 4 点未満を軽度、4 ~ 7 点を中等度、8 点以上を重度とした。

Table 1. NSS 評価項目

Task	Points (success/failure)
1. Exit a circle within 3min	0/1
2. Presence of seeking behavior	0/1
3. Ability to walk straight	0/1
4. Ability to walk on a 3cm wide beam	0/1
5. Ability to walk on a 2cm wide beam	0/1
6. Ability to walk on a 1cm wide beam	0/1
7. Ability to balance on a 7mm wide beam	0/1
8. Ability to balance on a round stick	0/1
9. Absence of mono-or hemiparesis	0/1
10. Presence of startle reflex	0/1
Total score	0 ~ 10

2-2. 頭部外傷モデルマウスの脳における組織学的評価

CCI 負荷後 Day 4 にインフルラン麻酔下で脳及び肺組織のサンプルを採取した。心臓から PBS を灌流後、肺組織を取り出し -80℃ に保存した。また PBS 灌流後、脳を固定するために 4% paraformaldehyde (PFA) でさらに灌流した。その後、脳を取り出して PFA に 4℃ で一晩放置した。固定した脳組織は、20% スクロース溶液に浸透させ、4℃ で保存した。スクロースに置換後、20µm の厚さの凍結切片を作成し、H & E 染色及び免疫組織染色を行い脳を組織学的に評価した。

2-3. 神経細胞 (SH-SY5Y) におけるバレニクリンの神経保護効果

神経細胞は、SH-SY5Y を用いた。10% FBS、100U/mL penicillin/streptomycin、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸を含む E-MEM/Ham'S F-12 培地で培養し、60mm dish に播種した。培

養条件は 37℃、5% CO₂/95% 大気下とした。SH-SY5Y cells にバレニクリン 0-10µM を処置し、HMGB1 のタンパク発現を評価した。

3. 肺におけるバレニクリンの効果

3-1. 頭部外傷モデルマウスの肺組織におけるバレニクリンの効果

採取した肺組織は、使用するまで -80℃ に保存した。肺組織は、ホモジネート後にタンパク定量を行い、ウエスタンブロット法により、HMGB1 及び cyclooxygenase2 (COX2) の発現を評価し、頭部外傷モデルマウスの肺組織において、炎症に対するバレニクリンの効果を検証した。

3-2. 肺胞マクロファージ細胞におけるバレニクリンの効果

肺胞マクロファージは MH-S cells を用いた。0.05mM 2-メルカプトエタノール、10% FBS 及び 100U/mL penicillin/streptomycin を添加した RPMI1640 培地で培養し、60mm dish に播種した。培養条件は 37℃、5% CO₂/95% 大気下とした。炎症を誘発させるため lipopolysaccharide (LPS; 50ng/mL) とバレニクリン (0, 0.1, 1, 10µM) で 4 時間処理し、COX2 タンパク発現をウエスタンブロット法で評価した。

< 結果 >

CCI 及びバレニクリンによる NSS と体重の経時的变化

CCI + vehicle 及び CCI + varenicline 群において、CCI 処置 1 時間後における NSS 値の中央値は、いずれも 5 で右足に麻痺が残るような中等度の傷害であった。一方、CCI 処置 4 日後の NSS 値は、vehicle 及びバレニクリンを投与した CCI マウスにおいて、それぞれ中央値が 2 と 1.5 であった。このことから、NSS はバレニクリン投与により、CCI の傷害を軽微に改善した (Figure

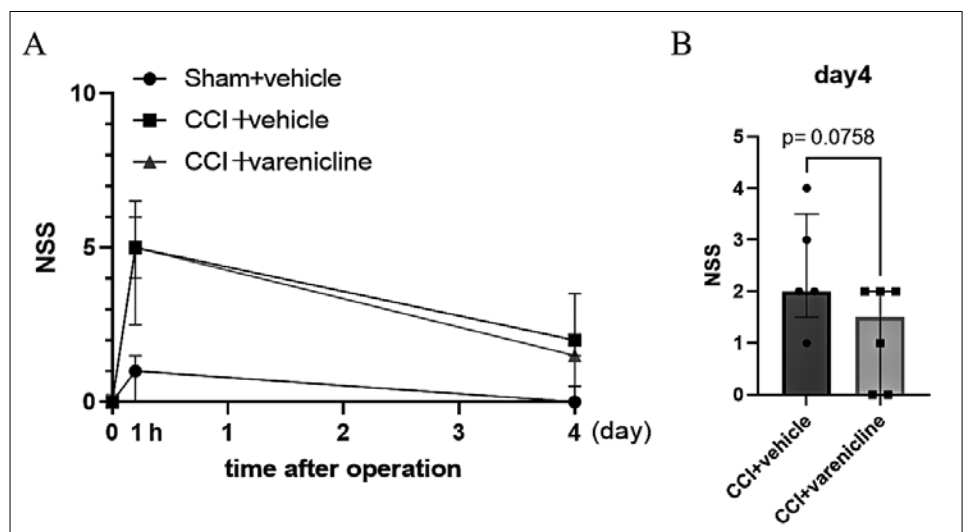


Figure 1. CCI モデルマウスにおける NSS に対する varenicline の効果

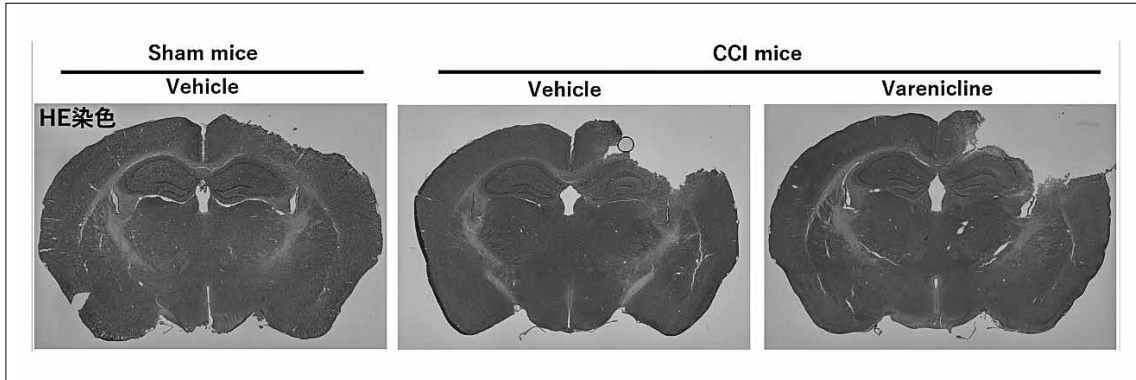


Figure 2. CCI 負荷による脳組織欠損に対する varenicline の効果

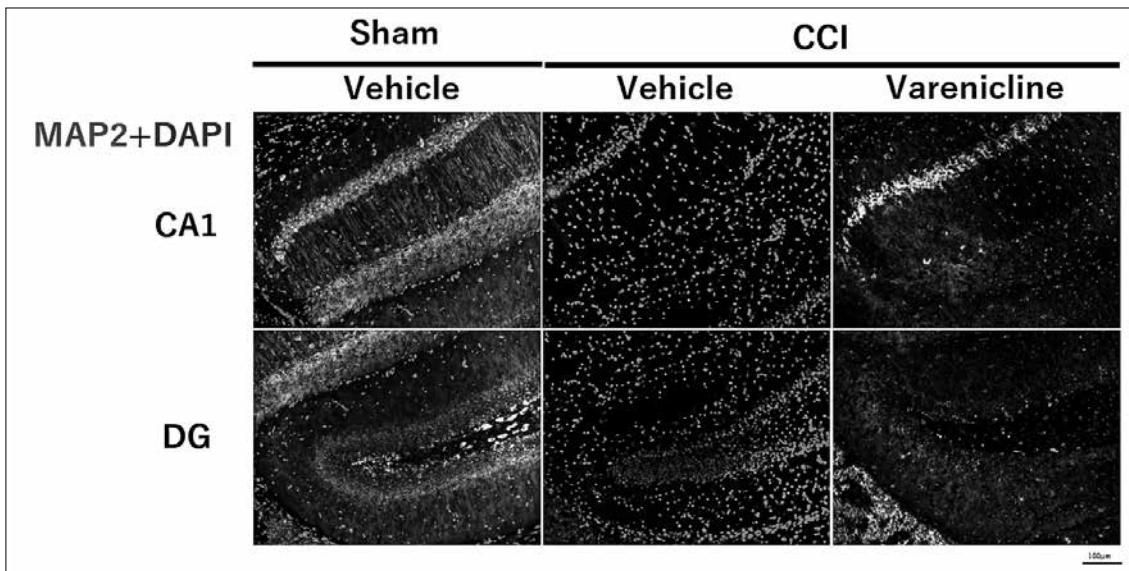


Figure 3. CCI モデルマウスの海馬における脳神経樹状突起に対する varenicline の効果

1)。

また、sham + vehicle、CCI + vehicle 及び CCI + varenicline の 3 群間で体重変化に差はなかった。

バレンクリンによる CCI 負荷による脳組織欠損への効果

H & E 染色により組織の形態を比較したところ、CCI + vehicle 群では sham + vehicle と比較すると皮質及び海馬の一部に欠損が認められ、脳が損傷していた。一方、CCI + vehicle 群、CCI + varenicline 群間で比較すると、脳組織の欠損に差は認められなかった。よって、バレンクリンは、CCI による脳組織の欠損を抑制・改善しなかった (Figure 2)。

バレンクリンによる脳神経細胞の樹状突起への影響

神経保護作用を評価するため、MAP-2 (神経細胞における樹状突起のマーカー) の蛍光免疫染色を行なった。海馬 CA1 及び DG (歯状回) において、sham + vehicle 群では MAP-2 が明確に発現していた。CCI 負荷により、MAP-2 の発現が減少した。一方、バレンクリンは CCI による MAP-2 発現減少を抑制した (Figure 3)。

したがって、バレンクリンは CCI による神経細胞の樹状突起の消失を抑制した。

バレンクリンによる脳神経細胞の細胞核・細胞体への影響

NeuN 抗体を用いて、蛍光免疫染色を行い神経細胞における細胞核・細胞体へのバレンクリンの効果を評価した。sham 群では神経細胞の細胞体が明確であるのに対し、CCI 負荷により、NeuN 発現量が減少した。しかし、バレンクリンを投与しても、CCI 負荷による NeuN 発現減少に変化はなかった (Figure 4)。

BBB 傷害による fibrinogen の血管外漏出に対するバレンクリンの効果

TBI によって fibrinogen が血管外 (脳実質側) へ漏出することから、fibrinogen 抗体及び lectin (血管のマーカー) 抗体を用いて蛍光免疫染色し、血管からの fibrinogen 漏出を各群間で比較した。海馬 CA1 部位において、sham + vehicle 群では fibrinogen は血管外に漏出していないことが観察された。一方、CCI 負荷によ

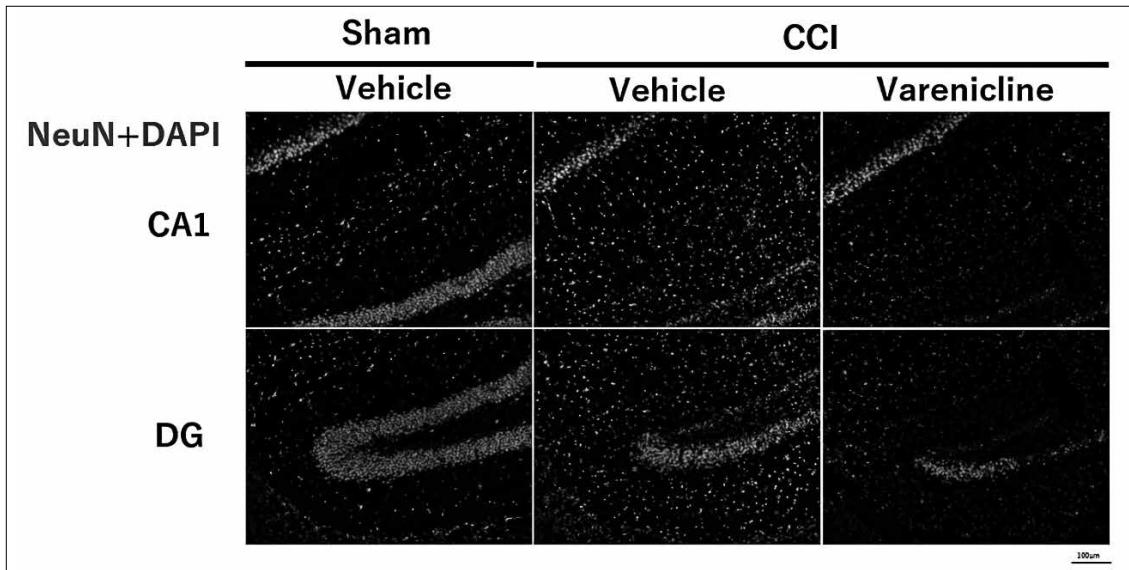


Figure 4. CCI モデルマウスの海馬における NeuN 発現に対する varenicline の効果

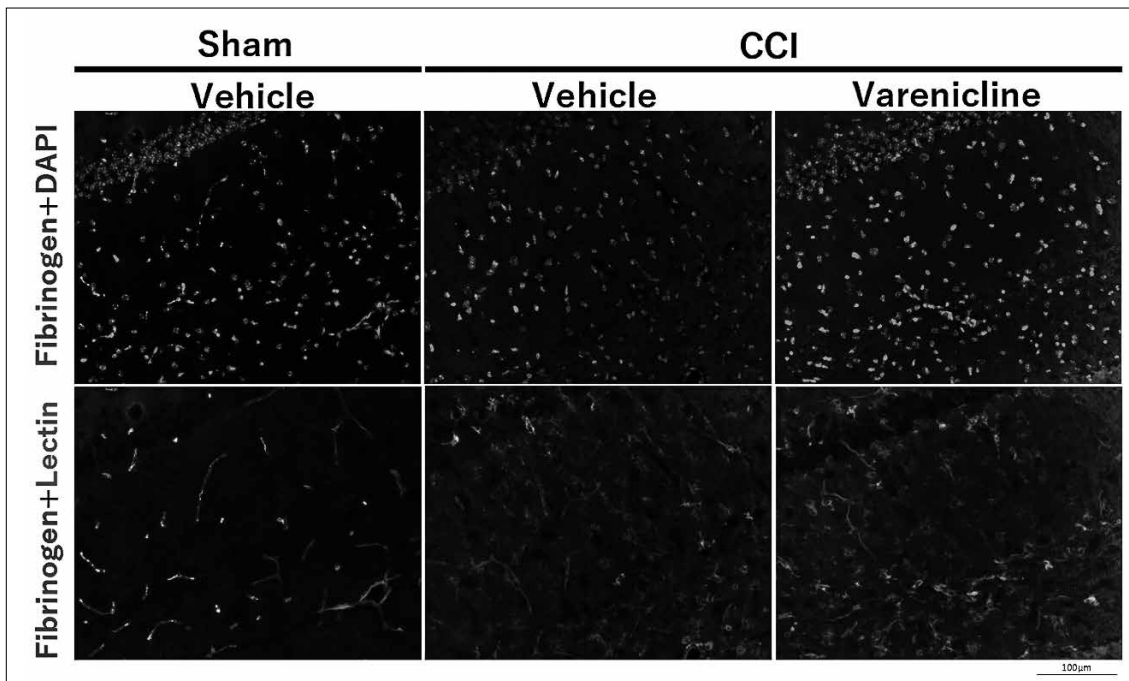


Figure 5. CCI モデルマウスにおけるフィブリノーゲンの血管外漏出に対する varenicline の効果

り fibrinogen が血管外に漏出し、海馬の実質内に広く拡散していた。しかし、バレニクリンは CCI 負荷による fibrinogen の血管外漏出を変化させなかった (Figure 5)。

神経細胞 (SH-SY5Y) におけるバレニクリンによる HMGB1 発現変化

SH-SY5Y にバレニクリンを 0-10µM を 24 時間処理し、HMGB1 の発現を評価した。

バレニクリンは、HMGB1 発現を減少させることが観察され、3µM で最も顕著であった (Figure 6)。

CCI モデルマウスの肺組織におけるバレニクリンによる

HMGB1 及び COX-2 発現変化

肺組織における COX2 発現は、sham + vehicle 群と比較して、CCI + vehicle 群では差がみられなかった。一方、バレニクリン投与により、sham + vehicle 群及び CCI + vehicle 群と比較して、減少していた。CCI によって COX2 発現は増加しないが、CCI と関係なくバレニクリンは肺組織で COX2 発現を抑制する傾向であった (Figure 7)。

一方で、SH-SY5Y cells においてバレニクリンによって発現減少した HMGB1 は、肺組織で発現していたが、CCI 及びバレニクリンによって発現に差はなかった (Figure 7)。

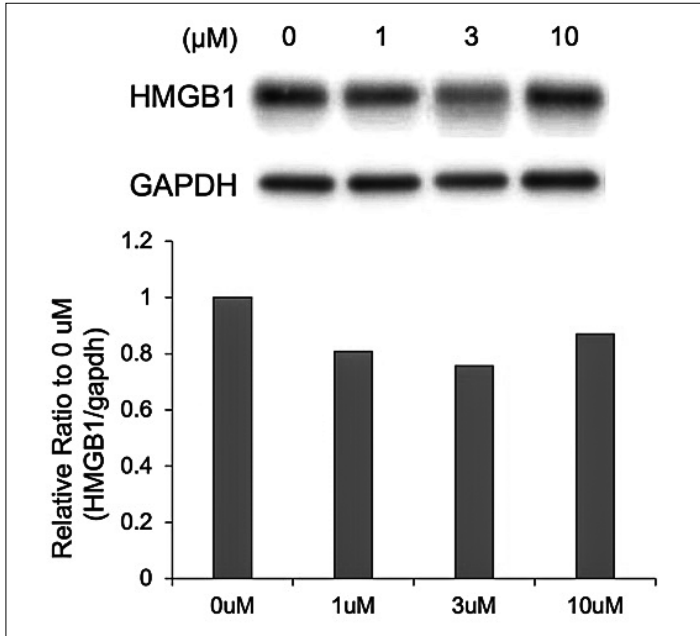


Figure 6. SH-SY5Y cells における varenicline による HMGB1 発現変化

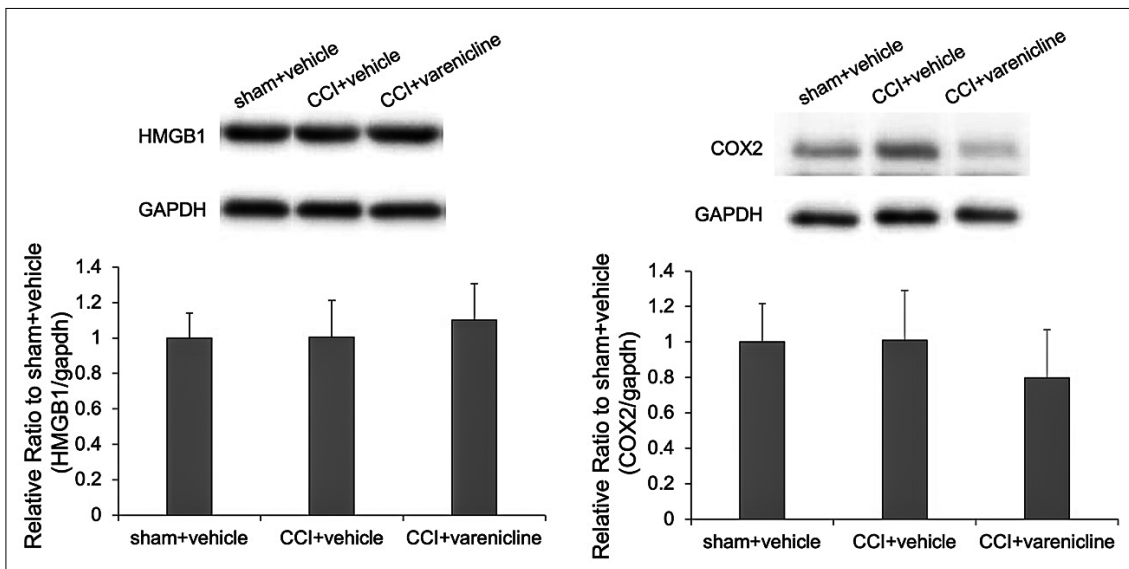


Figure 7. CCI モデルマウスの肺組織における varenicline による HMGB1 及び COX2 発現

肺胞マクロファージ (MH-S cells) におけるバレニクリンによる COX2 発現変化

バレニクリンは、肺組織において COX2 発現を減少させた。そこで、肺胞マクロファージ (MH-S cells) におけるバレニクリンによる COX2 発現変化を評価した。LPS 処理により COX2 発現を誘発させ、バレニクリン処理したところ、LPS 誘発 COX2 発現増加をバレニクリンは濃度依存的に抑制した (Figure 8)。

< 考察 >

今回の研究では、CCI による頭部外傷の脳損傷 (Figure 2) 及び fibrinogen の血管外漏出 (Figure 5) に対して、バレニクリンは効果を示さなかった。しかし、CCI による

神経突起の減少を抑制する傾向にあり (Figure 3)、神経細胞を保護する可能性がある。つまり、バレニクリンは頭部外傷を受傷した後の重症化を抑制、後遺症を軽減する可能性がある。

HMGB1 は、自然免疫応答を介して炎症を促進し、敗血症や自己免疫疾患、神経疾患など種々の炎症性疾患の病態を増悪させる。SH-SY5Y cells において、バレニクリンが HMGB1 発現を抑制する傾向にあった (Figure 6)。したがって、バレニクリンは脳における神経細胞への炎症を軽減する可能性があり、頭部外傷に限らず、脳内の炎症を抑制するかもしれない。また頭部外傷を受傷した脳から放出される HMGB1 などの炎症性メディエーターは肺機能を低下させる。バレニクリンは、SH-

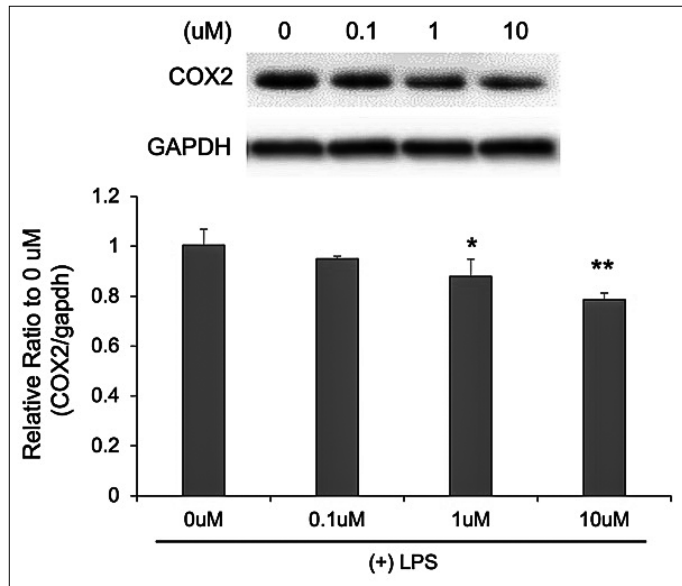


Figure 8. MH-S cells における LPS 誘発 COX2 発現に対する varenicline の効果

SY5Y cells における HMGB1 発現を抑制するため、脳からの HMGB1 の放出を抑制することで肺傷害を保護するかもしれない。

しかし、肺組織においては、CCI による顕著な肺傷害を観察できず、また CCI 負荷及びバレニクリン投与は、肺における HMGB1 発現に影響しなかった (Figure 7)。一方で、バレニクリンが CCI 負荷とは関係なく、肺組織での COX2 発現を抑制する傾向であった (Figure 7)。また、我々は PPE 誘発の肺傷害をバレニクリンが改善することを報告している (Koga et al. 2018 J Pharmacol Sci)。このように、バレニクリンは頭部外傷による肺傷害に限らず、肺における炎症に対して有用である可能性が示唆される。

バレニクリンは、神経細胞の nAChR に作用することで禁煙効果を発揮することから、脳において作用する。しかし、肺組織において、バレニクリンの作用点である $\alpha 4$ 、 $\beta 2$ 及び $\alpha 7$ nAChR の発現を確認している。したがって、バレニクリンは中枢だけでなく、肺においても直接作用し、炎症を抑制するかもしれない。

今回は、動物へのバレニクリンの投与量は、1 mg/kg/day で投与期間も 5 日間と短期間であるため、バレニクリンの効果が顕著ではなかったかもしれない。また CCI による肺傷害も明確ではなかった。したがって、CCI 負荷の程度、CCI 負荷後から評価までの期間、バレニクリンの投与量・投与期間を検証することで、頭部外傷の脳及び肺において効果が期待できるかもしれない。今後の課題としたい。

< 参考文献 >

David A Zygum, John B Kortbeek, Gordon H Fick, Kevin B Laupland, Christopher J Doig. Non-neurologic organ dysfunction in severe traumatic brain injury. Crit

Care Med. 2005 Mar; 33 (3): 654-60. doi: 10.1097/01.ccm.0000155911.01844.54.

Koga M, Kanaoka Y, Tashiro T, Hashidume N, Kataoka Y, Yamauchi A. Varenicline is a smoking cessation drug that blocks alveolar expansion in mice intratracheally administrated porcine pancreatic elastase. J Pharmacol Sci. 2018 Jun; 137 (2): 224-229. doi: 10.1016/j.jphs.2018.06.007. Epub 2018 Jun 20.

Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. Lancet Neurol. 2008 Aug; 7 (8): 728-41. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70164-9.

Sakai K, Takata F, Yamanaka G, Yasunaga M, Hashiguchi K, Tominaga K, Itoh K, Kataoka Y, Yamauchi A, Dohgu S. Reactive pericytes in early phase are involved in glial activation and late-onset hypersusceptibility to pilocarpine-induced seizures in traumatic brain injury model mice. J pharmacol Sci. 2021 Jan; 145 (1): 155-165. doi: 10.1016/j.jphs.2020.11.008. Epub 2020 Nov 23.

Verbois SL, Scheff SW, Pauly JR. Chronic nicotine treatment attenuates alpha 7 nicotinic receptor deficits following traumatic brain injury. Neuropharmacology. 2003 Feb; 44 (2): 224-33.

Weber DJ, Gracon AS, Ripsch MS, Fisher AJ, Cheon BM, Pandya PH, Vittal R, Capitano ML, Kim Y, Allette YM, Riley AA, McCarthy BP, Territo PR, Hutchins GD, Broxmeyer HE, Sandusky GE, White

FA, Wilkes DS. The HMGB1-RAGE axis mediates traumatic brain injury-induced pulmonary dysfunction in lung transplantation. *Sci Transl Med*. 2014 Sep 3; 6 (252): 252ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.3009443.

<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 197108)

【研究業績】

<原著論文>

Varenicline aggravates atherosclerotic plaque formation in nicotine-pretreated ApoE knockout mice due to enhanced oxLDL uptake by macrophages through downregulation of ABCA1 and ABCG1 expression.

Koga M, Kanaoka Y, Okamoto M, Nakao Y, Inada K, Takayama S, Kataoka Y, Yamauchi A. *J Pharmacol Sci*. 2020 Jan; 142 (1): 9-15.

Hesperidin blocks varenicline-aggravated atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice by downregulating net uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Mitsuhiwa Koga, Yuki Kanaoka, Koshun Inada, Sai Omime, Yasufumi Kataoka, Atsushi Yamauchi. J Pharmacol Sci*. 2020 Jun 143 (2): 106-111.

Kenta Sakai, Fuyuko Takata, Gaku Yamanaka, Miho Yasunaga, Kana Hashiguchi, Kazuki Tominaga, Kouichi Itoh, Yasufumi Kataoka, Atsushi Yamauchi, Shinya Dohgu. Reactive pericytes in early phase are involved in glial activation and late-onset hypersusceptibility to pilocarpine-induced seizures in traumatic brain injury model mice. *J Pharmacol Sci*. 2021 Jan 145: 155-165.

Aono K, Matsumoto J, Nakagawa S, Matsumoto T, Koga M, Migita K, Tominaga K, Sakai Y, Yamauchi A. Testosterone deficiency promotes the development of pulmonary emphysema in orchietomized mice exposed to elastase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jun 18; 558: 94-101.

<総説>

動脈硬化巣と肺障害における禁煙補助薬バレニクリンの作用の相違

古賀允久、高田二郎、山内淳史

BIO Clinica 2021 Mar; 36 (3): 76-78

動脈硬化症と COPD における禁煙補助薬バレニクリンの効果

古賀允久、高田二郎、山内淳史

Medical Science Digest 2020 Oct; 46 (11): 704-705

<学会発表>

COPD モデルマウスにおけるリポキシン A4 に対するエストロゲンの影響

富永宏治、青野健太郎、松本純一、古賀允久、山内淳史、江川 孝、片岡泰文

日本薬学会第 140 年会 (京都)、2020 年 3 月 25-28 日

Effects of noggin treatment on fibrinogen leakage into brain through a disrupted BBB in a mouse model of traumatic brain injury.

Fuyuko Takata, Miho Yasunaga, Takuro Iwao, Shinya Dohgu. 4 th Mini-Symposium on the Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research. 2022 年 3 月 24 日 (リモート)

BMP 拮抗物質 noggin は頭部外傷による fibrinogen 脳内漏出を抑制する

安永美保、高田美友子、井上愛菜、永井友貴、岩尾卓朗、道具伸也

日本薬学会第 142 年会 2022 年 3 月 28 日 名古屋 (リモート)