

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06809

研究課題名(和文) 高尿酸血症病態における禁煙補助薬バレニクリンによる動脈硬化進展の加速・増悪機序

研究課題名(英文) Exacerbation mechanism of atherosclerosis progression by varenicline in hyperuricemia

研究代表者

山内 淳史 (Yamauchi, Atsushi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：90341453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：経口禁煙補助薬バレニクリンは禁煙治療で成果を挙げているが、動脈硬化巣形成を促進する可能性が報告されている。一方で最近、高尿酸血症が動脈硬化発症に影響することが示唆されている。本研究では、高尿酸血症状態ではバレニクリンによる動脈硬化発症が増加すると仮説を立て、動物および細胞実験を行った。

高尿酸血症モデルマウスでは、バレニクリン誘発動脈硬化巣形成が促進された。この作用はバレニクリンが惹起するマクロファージの脂質取込、排出に関わる分子CD36、LOX-1、ABCG1の発現量変動を介したのではなく、炎症性サイトカインIL-6の増加が関与していることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喫煙者は男性に多く、バレニクリンによる禁煙治療実施数も多い。また高尿酸血症も男性に多く、その潜在的患者数は500万人ともいわれる。以上を考慮すると、高尿酸血症状態でバレニクリン禁煙治療が実施される可能性が高いことが推察され、本研究成果は動脈硬化増悪を注意喚起する根拠となる基礎実験情報といえる。また、作用機序としての分子機構については、今後の研究が待たれるが、尿酸単独で炎症性サイトカインIL-6発現増加が認められた点は興味深く、他の疾患発症との関連解析につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Varenicline has been reported to be successful in the treatment of smoking cessation but may promote atherosclerotic plaques formation. On the other hand, it has recently been suggested that hyperuricemia may influence the development of atherosclerosis. In this study, we hypothesized that varenicline-induced atherosclerosis development would be increased in hyperuricemia.

In a mouse model of hyperuricemia, varenicline-induced atherosclerosis plaques formation was enhanced. This effect was not mediated by varenicline-induced changes in expression of CD36, LOX-1, and ABCG1, molecules involved in macrophage lipid uptake and efflux, but rather by an increase in the inflammatory cytokine IL-6.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：動脈硬化 高尿酸血症 バレニクリン

1. 研究開始当初の背景

喫煙は、がんや脳卒中、虚血性心疾患、心筋梗塞だけでなく、気管支炎や肺気腫などの様々な全身疾患を発症、増悪させる危険因子である。喫煙は、喫煙者のみならず、非喫煙者においても受動喫煙による健康被害を惹き起こすため、禁煙に対する医学的、社会的関心も高まり、禁煙外来も設置されるなど医療重点課題として取り組まれている。

これまでの経口禁煙療法は、ニコチン代替療法が主であった。しかし、最近では経口禁煙補助薬であるバレニクリンによる禁煙治療が増加している。バレニクリンは、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 部分作動薬、 $\alpha 7$ nAChR 完全作動薬で、ニコチン禁断症状を軽減およびタバコによる快感を低減化する。したがって、ヘビースモーカーや度重なる禁煙非成功者、またニコチン含有禁煙補助薬による治療中断者等に対しても禁煙成功率が高い。

しかし、バレニクリンは嘔気、便秘などの消化器症状、不眠、悪夢、意識障害などの精神神経症状といった軽度から重度の副作用を発現する。また、特に動脈硬化症に併発する心血管イベントを上昇させ、重篤な心血管系副作用発現の危険性が指摘されている。従って、心・血管イベント発症を回避するためにバレニクリン禁煙療法が実施されるにもかかわらず、逆にそのリスクを増大させる可能性があることが推測される。

これまでに我々は、動脈硬化症モデルマウスである apolipoprotein E knockout (ApoE KO) マウスにバレニクリンを投与すると、 $\alpha 7$ nAChR を介して動脈硬化症の病像を悪化させることを明らかにした。さらに、バレニクリンはマクロファージにおいて、 $\alpha 7$ nAChR を介してスカベンジャー受容体 (LOX-1, CD36) の発現を増加させることにより、酸化 LDL の細胞内取り込み促進させることを明らかにした。

一方、近年、高尿酸血症は痛風の原因病態だけではなく、糖尿病、腎・肝機能低下、心血管疾患の独立した危険因子であるとの臨床報告が相次いでいる。それぞれの発症機序については不明な点が多いものの、高尿酸血症病態時には各臓器機能の変調が惹き起こされていると考えられる。最近、高尿酸血症ではマクロファージ上の LOX-1 および CD36 の発現量が増加し、これが動脈硬化を促進している可能性が指摘された。

成人男性 30 ~ 50 歳代の喫煙率は 35% 前後を推移していること (2017 年全国たばこ喫煙者率調査: JT) 男性に高尿酸血症が多いこと、バレニクリンの動脈硬化促進に LOX-1、CD36 が関与していること (前述) を考慮すると、高尿酸血症を背景にもつ男性ではバレニクリン禁煙療法における動脈硬化性有害作用の発症が増加するのではないかと仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、バレニクリンによる動脈硬化症誘発に対する高尿酸血症の影響を明らかにすることを目的に、(1) バレニクリン誘発性動脈硬化症形成・進展・不安定化に対する尿酸の影響、(2) 動脈硬化症での LOX-1、CD36 発現に及ぼすバレニクリンと尿酸の相互作用、(3) マクロファージでの LOX-1、CD36 を介したバレニクリンと尿酸の相互作用について検証する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および高尿酸食調製

8 週齢の動脈硬化症モデルマウスである apolipoprotein E knockout (ApoE KO) マウスを用いた。飼料 (CE-2; 日本クレア株式会社) および水は自由に摂取できるようにし、恒温恒湿、明暗 12 時間周期 (明期 AM7:00-PM7:00) で飼育した。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験指針に従った。高尿酸血症誘導のための高尿酸食は、CE-2 飼料に 2.5 % オキソ酸 (WAKO) および 1 % 尿酸 (WAKO) を混合したものの作製した。

(2) 血中尿酸濃度測定

血中尿酸濃度は、尿酸 C-テストワコーキット (WAKO) を用いて測定した。測定は duplicate とし、検量線より濃度を計算した。

(3) バレニクリン誘発動脈硬化症形成に及ぼす高尿酸血症の影響

8 週齢 ApoE KO マウスに通常食あるいは高尿酸食を与え、13 週齢時から vehicle として生理食塩水、1 mg/kg/day バレニクリンを 4 週間連日で皮下投与した。最終日に大動脈を回収し、脂肪など取り除いた後、血管を開き oil red O 染色により動脈硬化症を特定し、動脈硬化症面積を測定した。

(4) マクロファージの CD36、LOX-1、ABCG2 および IL-6 発現に及ぼすバレニクリンおよび尿酸の影響

マクロファージは RAW264.7 細胞を用い、60 mm dish に 8×10^5 個で播種し、37 °C で培養した。培養した細胞を無血清培地で 3 時間培養し、バレニクリンを 1, 5 及び 10 μ M で 24 時間処理後、細胞を回収した。回収したサンプルは、タンパク定量後に、20 μ g/well でウエスタンブ

ロットを行い、スカベンジャー受容体である CD36、LOX-1、酸化 LDL 排出トランスポーターである ABCG1 および炎症性サイトカイン IL-6 の発現量を評価した。また、同様に RAW264.7 細胞を培養し、バレニクリン (10 μ M) 及びバレニクリン + 尿酸 (最終濃度を 7mg/dL) で 24 時間処理し、高尿酸による CD36 及び LOX-1 の発現を評価した。

(5) 統計解析

2 群間の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。多群間の比較には一元配置分散分析および Dunnett 法を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差で表し、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 血中尿酸濃度

高尿酸食摂食による血中尿酸濃度は、通常食 (Normal) 群と比較して高尿酸食 (HU) 群で有意に増加していた (図 1)。ヒトでの高尿酸血症の基準値 7 mg/dL に対し、HU 群の尿酸濃度は約 5 mg/dL であったが、マウスなどげっ歯類では尿酸分解酵素により血中尿酸濃度が低く保たれていることから (Normal 群: 0.71 mg/dL) この濃度でもってマウスの高尿酸血症状態であるとした。

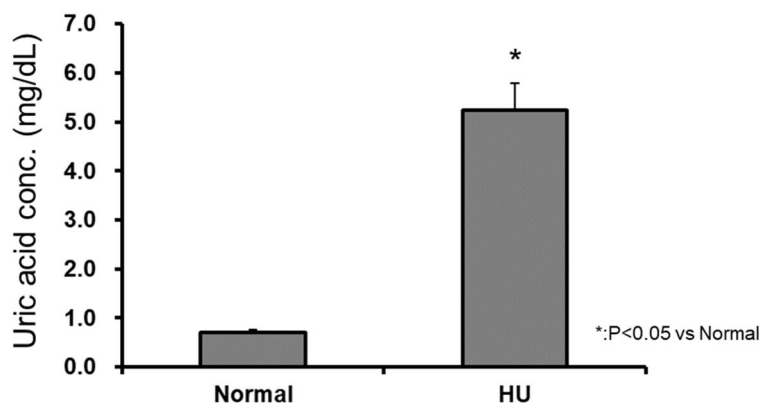


図 1 高尿酸食負荷後の血中尿酸濃度

(2) バレニクリン誘発動脈硬化巣形成に及ぼす高尿酸血症の影響

通常食を与えたマウスの全大動脈及び大動脈弓において、バレニクリンは vehicle と比較して、動脈硬化巣の形成を促進させた。また、バレニクリンによる動脈硬化巣の形成促進は、尿酸の負荷によって増悪した (図 2)。

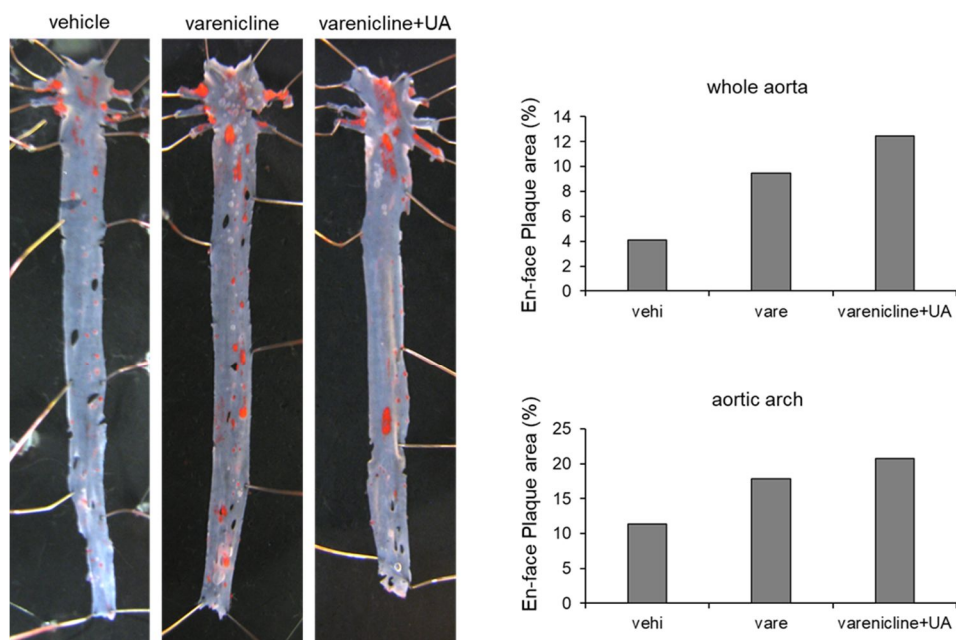


図 2 バレニクリン誘発動脈硬化巣形成に及ぼす高尿酸血症の影響

(3) マクロファージにおけるスカベンジャー受容体 CD36、LOX-1、酸化 LDL 排出トランスポーター ABCG1 および炎症性サイトカイン IL-6 発現量に及ぼす尿酸の影響

バレニクリンは、濃度依存的に CD36 及び LOX-1 の発現を増加させ、10 μ M 処理で最も増加させた (図 3)。

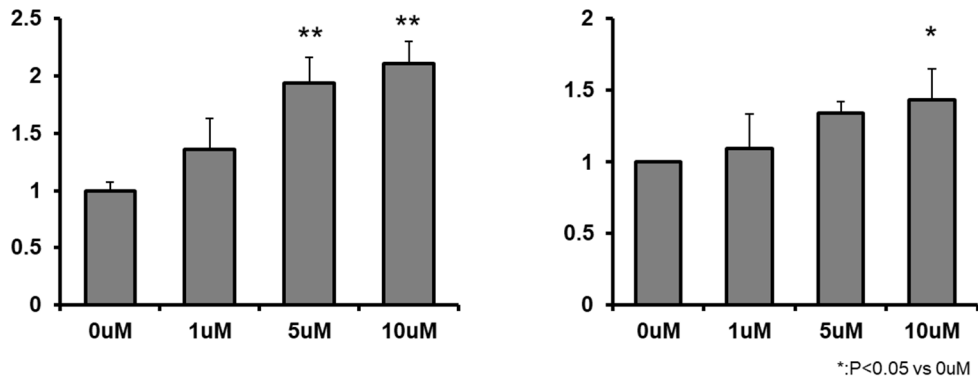


図 3 スカベンジャー受容体 CD36、LOX-1 発現量に及ぼすバレニクリンの影響

また、バレニクリン (10 μ M) は、酸化 LDL 排出トランスポーターである ABCG1 発現を有意に減少させた (図 4)。すなわちバレニクリンは、これらの発現変動を介して動脈硬化巢形成促進をもたらすことが示唆された。

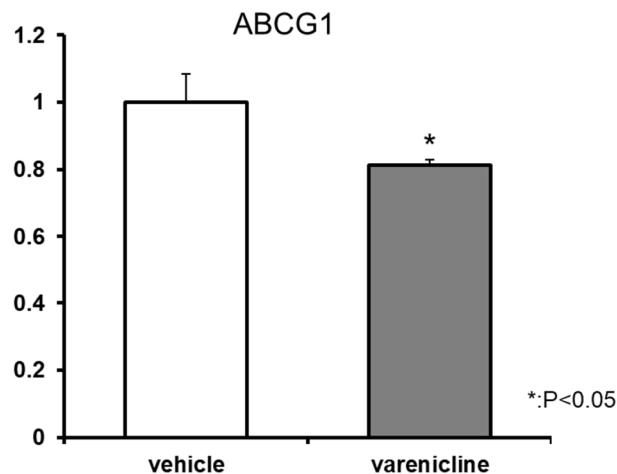


図 4 酸化 LDL 排出トランスポーター ABCG1 発現量に及ぼすバレニクリンの影響

(4) バレニクリン誘発 CD36、LOX-1、ABCG1 発現量変動に及ぼす尿酸の影響

尿酸は、バレニクリンによる CD36、LOX-1 の発現増加および ABCG1 の発現現象に影響しなかった (図 5)。

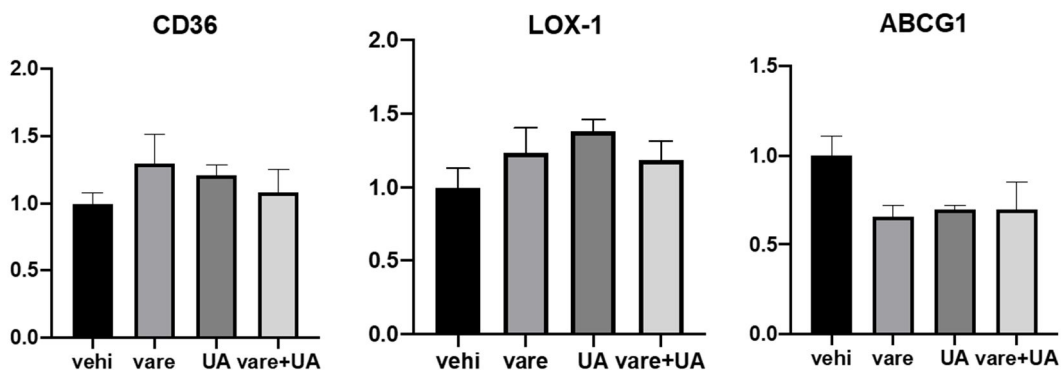


図 5 バレニクリン誘発 CD36、LOX-1、ABCG1 発現量変動に及ぼす尿酸の影響

(5) 炎症性サイトカイン IL-6 発現量変動に及ぼすバレニクリンおよび尿酸の影響

マクロファージにおける炎症性サイトカイン IL-6 の発現量は、vehicle と比較して、バレニクリンによって変化しなかった。一方、尿酸は IL-6 発現量を有意に増加させた。さらに、尿酸単独処理と比較して、バレニクリン + 尿酸処理では有意な IL-6 の発現の上昇が認められた (図 6)

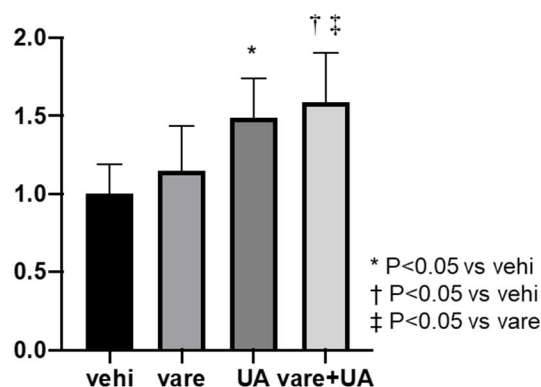


図 6 IL-6発現量変動に及ぼすバレニクリンおよび尿酸の影響

以上より、高尿酸血症状態でバレニクリンによる動脈硬化巣形成促進は増悪する可能性が示唆された。この作用はバレニクリンのスカベンジャー受容体 CD36 および LOX-1 の発現増加および酸化 LDL 排出トランスポーターABCG1 発現減少を介したのではなく、炎症性サイトカイン IL-6 発現増加によるものであることが推察された。尿酸が単独で IL-6 発現を増加させたことを含め、今回認められた動脈硬化巣形成に及ぼす影響の分子機序についての解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koga Mitsuhisa, Kanaoka Yuki, Inada Koshun, Omine Sai, Kataoka Yasufumi, Yamauchi Atsushi	4. 巻 143
2. 論文標題 Hesperidin blocks varenicline-aggravated atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice by downregulating net uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 106 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.01.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koga Mitsuhisa, Kanaoka Yuki, Okamoto Mana, Nakao Yuki, Inada Koshun, Takayama Saki, Kataoka Yasufumi, Yamauchi Atsushi	4. 巻 142
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 9 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 彩乃、古賀 允久、高田 二郎、山内 淳史
2. 発表標題 断酒補助薬アカンプロサートはマクロファージにおいてスカベンジャー受容体発現を減少させ酸化LDLの取り込みおよび動脈硬化巣形成を抑制する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古賀 允久、稲田 紘舜、山田 彩乃、稲富 千夏、上村 美結、寺本 千紗、高田 二郎、山内 淳史
2. 発表標題 飲酒量低減薬ナルメフェンは、マクロファージ内への酸化LDLの取り込みを促進させ、apolipoprotein E knockoutマウスにおける動脈硬化巣形成を促進させる
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	古賀 允久 (Koga Mitsuhsisa) (60570801)	福岡大学・薬学部・准教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------