

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07146

研究課題名(和文) 飲酒量低減薬ナルメフェンによる動脈硬化症の発症機序

研究課題名(英文) Mechanism of atherosclerotic plaque formation by nalmefene, an opioid modulator for the reduction of alcohol consumption

研究代表者

古賀 允久 (Koga, Mitsuhsa)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：60570801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、飲酒量低減薬ナルメフェンの有害作用による動脈硬化症発症・進展の可能性を検証し、その機序を明らかにすることを目的とした。ナルメフェンは、動脈硬化症モデルマウスであるアポリポロタンE欠損マウスにおいて、動脈硬化巣の形成および動脈硬化巣内のマクロファージの泡沫化を促進させるリスクがあることを明らかにした。また、ナルメフェンがマクロファージにおいてスカベンジャー受容体CD36発現を増加させ、oxidized low-density lipoproteinの細胞内取り込みを促進させることにより、そのマクロファージの泡沫化を促進させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飲酒量低減を目的としたナルメフェンによる治療が増加すると予測される中で、有害事象のリスクを検討することは、極めて重要である。本研究では、動物実験および細胞実験により、飲酒量低減薬ナルメフェンが動脈硬化巣の形成促進・不安定化させるリスクがあることを明らかにした。本成果はナルメフェンの安全性に関する注意喚起を促す実験証拠を提示する点で医療的に意義深い。またナルメフェン有害作用の予測・軽減・回避対策の構築が可能となり、本薬物の安全性と有用性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減酒・断酒効果を有する新薬の開発へと繋げることも可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nalmefene, an opioid receptor modulator, is a reducing alcohol consumption drug for patients with alcohol dependence. Opioid receptors involve in peripheral inflammatory diseases such as colitis and arthritis. In this study, we determined if nalmefene increases risk of atherosclerosis, one of inflammatory diseases. Apolipoprotein E knockout (ApoE KO) mice were fed a high-fat diet and intraperitoneally administrated with vehicle (saline) or nalmefene (1 and 3mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) for 21 days. The atherosclerotic plaque formation in ApoE KO mice was dose-dependently progressed by nalmefene treatment. In addition, nalmefene significantly increased the monocyte/macrophage-positive area in aorta in ApoE KO mice. Furthermore, nalmefene significantly increased oxLDL uptake in macrophage cells. Additionally, nalmefene increased the expression of CD36. Therefore, nalmefene may progress the atherosclerotic plaque formation by enhancing oxLDL uptake into macrophages in atherosclerotic plaque.

研究分野：有害作用

キーワード：心血管イベント 動脈硬化症 ナルメフェン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

飲酒による危害を減らすという”harm reduction”の概念が提唱され、これまでの治療目的である「断酒」から「減酒」も有効である方針が、日本アルコール・アディクション学会と日本アルコール関連問題学会から示された。そのニーズにあった薬物治療として、飲酒量低減薬ナルメフェンが期待されている。その一方で、ナルメフェンは動脈硬化症、虚血性心疾患などの重篤な副作用が発現する可能性がある。しかし、この発症機序に関する基礎的研究は殆どない。

#### 2. 研究の目的

本研究では、ナルメフェンの有害作用による動脈硬化症発症・進展の可能性を検証し、この機序を解明することで、ナルメフェンの有害作用の予防・軽減・回避対策の構築、また有用性・安全性のより高い新規治療薬の開発へと連結することを目的として本研究を企てた。すなわち、「ナルメフェンは、動脈硬化症を発症・進展させる。」という有害作用の仮説を検証し、その発症機序を追及した。

#### 3. 研究の方法

##### (1) ナルメフェンによる動脈硬化巣の形成・進展および不安定化に与える影響

8週齢の ApoE KO マウスにナルメフェン(1および3 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>、3週間)を投与し、全大動脈および大動脈起始部における動脈硬化巣を oil red O 染色で特定し、その陽性面積で動脈硬化巣面積を評価した。また、大動脈起始部における動脈硬化巣を MOMA (単球・マクロファージ)-2 抗体を用いて、免疫組織染色を行い、血管内膜内に浸潤し、泡沫化した細胞を特定した。

##### (2) 血中コレステロールに及ぼす影響

血中コレステロール(総コレステロール、トリグリセリド、HDL コレステロール)を測定し、血液成分に及ぼすナルメフェンの影響を検証した。

##### (3) RAW264.7 細胞におけるナルメフェンによるオピオイド受容体発現に及ぼす影響

RAW264.7 細胞にナルメフェン 300 µg/mL で 24 時間処理し、細胞から RNA を抽出した。リアルタイム PCR 法により、µ, および オピオイド受容体の発現を評価した。

##### (4) マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7 細胞)におけるスカベンジャー受容体発現変化

RAW264.7 細胞にナルメフェン 0~300 µg/mL で 24 時間処理し、oxidized low density lipoprotein (oxLDL)を細胞内に取り込むスカベンジャー受容体 (CD36, LOX-1 および SR-A)発現をウエスタンブロットで評価した。

(5) マウス腹腔マクロファージにおける oxLDL 細胞内取り込みに及ぼすナルメフェンの影響  
動脈硬化巣内のマクロファージが oxLDL の細胞内取り込み・蓄積により、プラークを不安定化させることから、培養マクロファージに、ナルメフェンを処理し、oxLDL の細胞内取り込みを評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ApoE KO マウスの全大動脈および大動脈弓における動脈硬化巣形成に対するナルメフェンの効果

ApoE KO マウスの全大動脈における動脈硬化巣形成に対するナルメフェンの効果を検討するため、ApoE KO マウスの全大動脈を oil red O で染色した。oil red O で赤く染まった部分が動脈硬化病変部位である (Figure 1A)。vehicle 群と比較して、ApoE KO マウスの全大動脈において、ナルメフェン 1mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> および 3mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> は動脈硬化巣形成をそれぞれ約 1.9 倍、約 3.5 倍有意に促進させた (各  $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ ) (Figure 1B)。また大動脈弓においてもナルメフェン 1mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> および 3mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>、3 週間投与によりそれぞれ約 1.9 倍および約 2.4 倍有意に促進させた (各  $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ )。

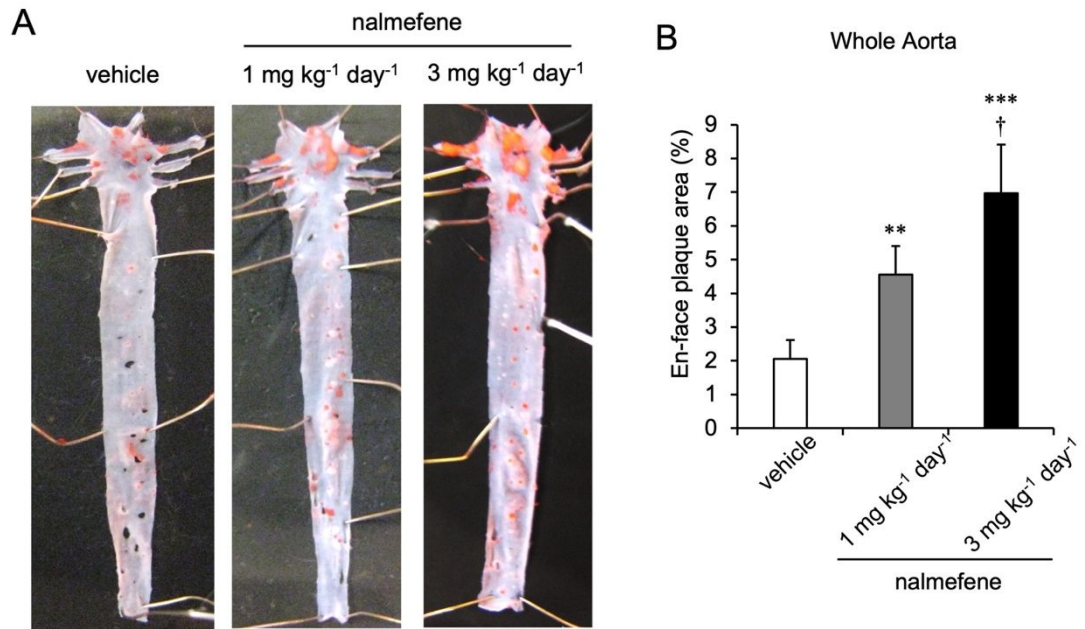


Figure 1 ApoE KO マウスにおけるナルメフェンの動脈硬化巣形成

また大動脈起始部においても、同様にナルメフェン濃度依存的に動脈硬化巣面積を有意に増大させた (Figure 2A, B)。さらに、ApoE KO マウスの大動脈起始部における単球・マクロファージの浸潤・泡沫化に対するナルメフェンの効果を検討するため、ApoE KO マウスの大動脈起始部における単球・マクロファージを免疫組織染色で評価した。MOMA2 により赤く染まった部分が動脈硬化巣の不安定化因子である単球・マクロファージである (Figure 2A)。ApoE KO マウスの大動脈起始部において、vehicle 群と比較して、ナルメフェン 3mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>はMOMA2 陽性面積を約 1.6 倍有意に増加させた ( $P < 0.05$ ) (Figure 2C)。

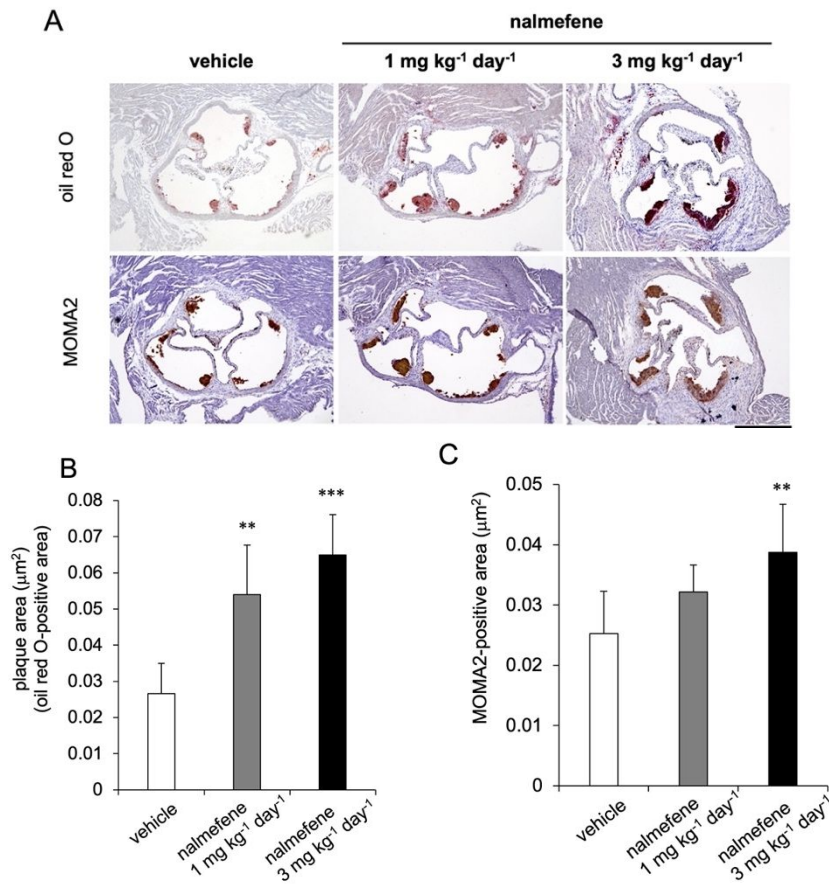


Figure 2 ApoE KO マウスの大動脈起始部におけるナルメフェンの効果

(2) 血中コレステロールに及ぼす影響

vehicle、ナルメフェン 1mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> および 3mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> 群における血漿総コレステロールは、それぞれ 1187.95 ± 266.18 mg/dL、1362.28 ± 262.91 mg/dL および 1537.17 ± 420.61 mg/dL であり、vehicle と比較してナルメフェン 3mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> 投与により有意に増加した。また、血漿トリグリセリドにおいて、vehicle (298.12 ± 100.57 mg/dL) と比較し、ナルメフェン 1mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> および 3mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> では、それぞれ 420.10 ± 129.03 mg/dL および 435.05 ± 151.12 mg/dL と有意に増加した (各 *P* < 0.05)

(3) RAW264.7 細胞におけるナルメフェンによるオピオイド受容体発現に及ぼす影響

RAW264.7 細胞において、ナルメフェン (300 μg / mL, 24 時間) は vehicle と比較して μ, および オピオイド受容体の mRNA 発現をそれぞれ約 70%、約 55% および約 40% 有意に減少させた (各 *P* < 0.05) (Figure 3)。

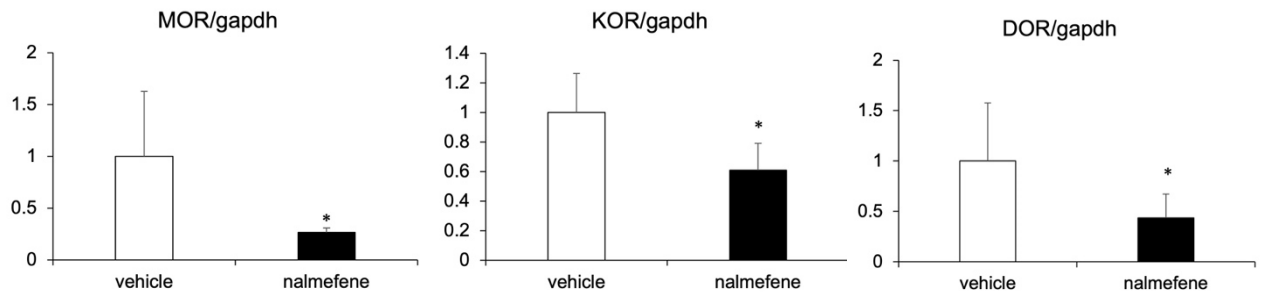


Figure 3 オピオイド受容体発現

(4) マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7 細胞) におけるスカベンジャー受容体発現変化  
RAW264.7 細胞にナルメフェン 0~300 μg/mL で 24 時間処理したところ、濃度依存的にスカベンジャー受容体である CD 36 タンパク発現を増加させ、300 μg/mL 処理で最も増加させた (Figure 4)。一方、ナルメフェンは LOX-1 および SR-A タンパク発現に影響を及ぼさなかった。したがって、ナルメフェンの濃度を 300 μg/mL とし、以下の実験を行った。

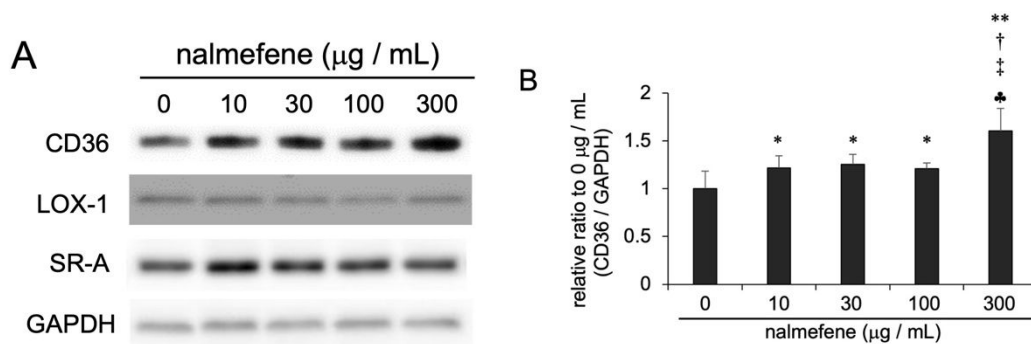


Figure 4 RAW264.7 細胞におけるスカベンジャー受容体発現

(5) 腹腔マクロファージにおけるナルメフェンの oxLDL 取り込みに及ぼす影響を検討した。培養した腹腔マクロファージにナルメフェン 300 μg / mL を 24 時間処理したのち、DiI 標識 oxLDL を添加し、oxLDL を取り込んだマクロファージの DiI 標識 oxLDL 陽性面積を比較した。青色が核、赤色が DiI 標識 oxLDL を示す (Figure 5A)。oxLDL 非添加群では DiI 陽性細胞は観察されなかったが、添加群では陽性細胞が多く観察された (Figure 3A)。1 細胞当たりの DiI 標識 oxLDL 陽性面積 (DiI 標識 oxLDL 陽性面積 / 全マクロファージ数) で評価したところ、ナルメフェン群では vehicle 群と比較して DiI 陽性面積を約 2.1 倍有意に増加した (*P* < 0.01) (Figure 5B)。

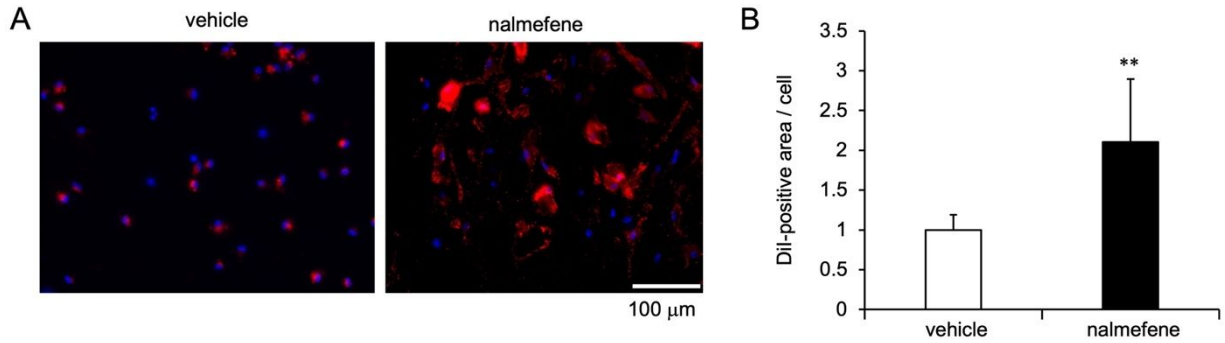


Figure 5 ナルメフェンによる oxLDL マクロファージ内取り込み

動脈硬化症が炎症性疾患の一つであること、また、オピオイド受容体が抗炎症作用に関与していることから、オピオイド受容体拮抗薬および部分作動薬であるナルメフェンが動脈硬化巣形成に及ぼす影響を動物実験・細胞実験により検討した。

まず、ApoE KO マウスに生理食塩水又はナルメフェン (1 および 3 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, ) を皮下投与した。その結果、全大動脈、大動脈弓および大動脈起始部において、ナルメフェン群は vehicle 群と比較して、動脈硬化巣形成を有意に促進させた (Figure 1, 2)。また、ApoE KO マウスの大動脈起始部において、ナルメフェン群は vehicle 群と比較して、MOMA2 陽性面積を有意に増加させた (Figure 2)。このことから、ナルメフェンは、単球・マクロファージの血管内膜への浸潤・泡沫化を増加させ、動脈硬化巣の形成および不安定化を促進させることが示唆された。

次に、ナルメフェンのオピオイド受容体の mRNA 発現に及ぼす影響を検討するため、RAW264.7 細胞を用いて real time PCR を行った。ナルメフェンは  $\mu$ 、および  $\delta$  オピオイド受容体の mRNA 発現を有意に減少させた (Figure 3)。よって、ナルメフェンはオピオイド受容体の発現を減少させ、抗炎症作用を抑制する可能性も考えられる。さらに、 $\mu$  オピオイド受容体作動によってマクロファージの CD36 の発現を減少させる (Valerio C et al., *Peptides*, 2011) ことから、ナルメフェンが  $\mu$  オピオイド受容体を減少させることで CD36 の発現減少効果を阻害することが考えられた。したがって、ナルメフェンがマクロファージ内への oxLDL 取り込み、泡沫化を促進することで、動脈硬化巣の形成および不安定化を促進した可能性がある。

次に、細胞実験でマクロファージの泡沫化に対するナルメフェンの効果を検討した。腹腔マクロファージにおいて、ナルメフェンは DiI 標識 oxLDL 陽性面積を有意に増加させたため (Figure 5)、oxLDL の細胞内取り込みが増加したことが明らかとなった。そこで、そのメカニズムを解明するため、泡沫化に関与するスカベンジャー受容体 (CD36, LOX-1 および SR-A) に着目し、RAW264.7 細胞を用いた細胞実験を行った。300  $\mu$ g / mL ナルメフェン処理により、CD36 の発現を有意に増加させた。このことから、ナルメフェンは、CD36 発現の増加により、マクロファージ内への oxLDL の取り込みを促進させ、動脈硬化巣形成を促進させることが示唆された。以上より、ナルメフェンは、動脈硬化巣形成および不安定化を促進し、心血管イベントのリスクを上昇させる可能性が示唆された。その作用には、オピオイド受容体の発現に関与することが示唆された。

飲酒量低減を目的としたナルメフェンによる治療の増加が予想される現状を考えれば、ナルメフェンによる有害事象が今後増加することが推測される。そのため、心血管イベントのリスクの高い患者には慎重に使用すべきかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Koga Mitsuhiisa, Kanaoka Yuki, Inada Koshun, Omine Sai, Kataoka Yasufumi, Yamauchi Atsushi   | 4. 巻<br>143                   |
| 2. 論文標題<br>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<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Pharmacological Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>106 ~ 111       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jphs.2020.01.012   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Goto Shotaro, Setoguchi Shuichi, Nagata-Akaho Nami, Terada Kazuki, Watase Daisuke, Yamakawa Hirofumi, Toki Erina, Koga Mitsuhiisa, Matsunaga Kazuhisa, Karube Yoshiharu, Takata Jiro         | 4. 巻<br>155                   |
| 2. 論文標題<br>Ester derivatives of phyllohydroquinone effectively deliver the active form of vitamin K1 topically, owing to their non-photosensitivity  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Pharmaceutical Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>105519 ~ 105519 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ejps.2020.105519   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Terada Kazuki, Murata Ayumi, Toki Erina, Goto Shotaro, Yamakawa Hirofumi, Setoguchi Shuichi, Watase Daisuke, Koga Mitsuhiisa, Takata Jiro, Matsunaga Kazuhisa, Karube Yoshiharu              | 4. 巻<br>25                    |
| 2. 論文標題<br>Atypical Antipsychotic Drug Ziprasidone Protects against Rotenone-Induced Neurotoxicity: An In Vitro Study  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Molecules  | 6. 最初と最後の頁<br>4206 ~ 4206     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/molecules25184206  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Setoguchi Shuichi, Nagata Akaho Nami, Goto Shotaro, Yamakawa Hirofumi, Watase Daisuke, Terada Kazuki, Koga Mitsuhiisa, Matsunaga Kazuhisa, Karube Yoshiharu, Takata Jiro                     | 4. 巻<br>46                    |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of photostability and phototoxicity of esterified derivatives of ubiquinol 10 and their application as prodrugs of reduced coenzyme Q 10 for topical administration              | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>BioFactors   | 6. 最初と最後の頁<br>983 ~ 994       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/biof.1678  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Koshun Inada, Mitsuhsa Koga, Ayano Yamada, Shinya Dohgu, Atsushi Yamauchi              | 4. 巻<br>629       |
| 2. 論文標題<br>Moxifloxacin induces aortic aneurysm and dissection by increasing osteopontin in mice | 5. 発行年<br>2022年   |
| 3. 雑誌名<br>Biochem Biophys Res Commun.  | 6. 最初と最後の頁<br>1-5 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2022.08.080   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-         |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>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<br>Nalmefene, a reducing alcohol consumption drug, enhanced oxLDL uptake in macrophages and aggravates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice. |
| 3. 学会等名<br>第95回日本薬理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>稲田 紘舜、古賀允久、山内淳史                      |
| 2. 発表標題<br>モキシフロキサシンによるオステオポンチンを介した大動脈瘤・解離の増悪作用 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本薬理学会年会                         |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田 彩乃、古賀 允久、稲田 紘舜、山内 淳史  |
| 2. 発表標題<br>飲酒量低減薬ナルメフェンはスカベンジャー受容体CD36発現増加による酸化LDLマクロファージ内取り込みおよび動脈硬化巣形成を促進する |
| 3. 学会等名<br>日本薬理学会第143回年会  |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>稲田 紘舜、古賀 允久、山田 彩乃、山内 淳史                                  |
| 2. 発表標題<br>モキシフロキサシンによるマクロファージにおけるオステオポンチン発現増加を介した 大動脈瘤・大動脈解離の発症・増悪 |
| 3. 学会等名<br>日本薬理学会第143回年会  |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山内 淳史<br><br>(Yamauchi Atsushi)<br><br>(90341453) | 福岡大学・薬学部・教授<br><br><br><br>(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 |
|---------|---------|