

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460236

研究課題名(和文) 禁煙補助薬バレニクリンによる脳神経血管機構を標的とした中枢性有害作用の発現機構

研究課題名(英文) Adverse effects of varenicline on the neurovascular unit

研究代表者

片岡 泰文 (Kataoka, Yasufumi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：70136513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：禁煙補助薬バレニクリンの自殺念慮、意識障害など重篤な中枢性有害作用発現には血液脳関門(BBB)の機能障害が関与する。本研究ではバレニクリンが標的受容体である $\alpha 7$ 及び $\alpha 4 \beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して BBB 機能を障害する可能性を追究した。(1) 脳血管内皮細胞には $\alpha 7$ nAChR を介した BBB 透過性制御機構が存在する。(2) ペリサイトの $\alpha 7$ nAChR 刺激は MMP-9 産生を誘発する。(3) ペリサイトは $\alpha 7$ nAChR アゴニストによる BBB 機能障害作用を増強する。以上、 $\alpha 7$ nAChR が BBB 機能障害発現に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Smoking cessation therapy with varenicline is associated with the increased risk of suicide or attempted suicide and depression, although varenicline exerts antidepressant-like effects as a partial agonist at $\alpha 4 \beta 2$ and full agonist at $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). These neuropsychiatric events may be attributed to the dysfunction of the neurovascular unit with hyperpermeability of the blood-brain barrier (BBB). The aim of this study is to determine nAChR subtype as a target for varenicline-induced BBB hyperpermeability. We found that (1) brain endothelial barrier was impaired by a long term exposure of the $\alpha 7$ nAChR agonist, (2) brain pericytes were the highest responsive cell type to the $\alpha 7$ nAChR stimulation in releasing the matrix metalloproteinase-9, and (3) brain pericytes enhanced the $\alpha 7$ nAChR agonist-induced brain endothelial hyperpermeability. These findings suggest that varenicline would induce BBB dysfunction by stimulating $\alpha 7$ nAChR.

研究分野：医療系薬学

キーワード：バレニクリン 血液脳関門 中枢性有害作用 ニコチン性アセチルコリン受容体 タイトジャンクシ
ン

1. 研究開始当初の背景

喫煙は、虚血性心疾患、脳血管障害、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの疾患 (喫煙リスク疾患) を発症・増悪させる危険因子である。これらの疾患では積極的な禁煙治療が推奨されている。これに伴い、経口禁煙補助薬バレニクリンの使用が著しく増加している (国内使用者約 85 万人/最近 3 年間)。これは、禁煙成功率や汎用性の点で他剤より優れていることに起因する。しかし、バレニクリンは、意識障害、自殺、自殺念慮、振戦など重篤なものから中程度の悪夢、興奮、抑うつ、不安などの中枢性有害作用を発現する。このため治療の中断を余儀なくされることも多い。実際、本国では意識障害に伴う自動車事故が発生し「安全性情報」により注意が喚起された。また、米国では自殺・自殺念慮を示す患者数が他の禁煙補助薬より多いと報告され (PLoS One 2011;e27016)、適応が制限されつつある。従って、これら中枢性有害作用は、バレニクリンによる禁煙治療推進の障壁となっており、この中枢性有害作用の発現機序を解明し、安全性対策構築へと繋げることが急務である。バレニクリンは $\alpha 4\beta 2$ ニコチン受容体 (nAChR) 部分作動薬であり、ドパミン (DA) 神経終末の $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介して DA 遊離を促進し、喫煙ニコチンの阻害作用とも併せて禁煙治療に優れた効果を発揮する。バレニクリンは脳神経に直接作用し薬効を現すことから、中枢性有害作用も神経直接作用に起因すると予測される。しかし、その矛盾を指摘する根拠となる報告や総説がある。すなわち、(1) バレニクリンは、海馬・大脳皮質において $\alpha 4\beta 2$ nAChR を刺激し、情動障害の改善に寄与する GABA 神経を活性化する (Neuropsychopharmacology, 2011 ; 36:1366)。 (2) 大脳辺縁系における $\alpha 4$ サブユニットを含む nAChR 及び $\alpha 4\beta 2$ nAChR の刺激は、それぞれ不安及び抑うつ行動を軽減する (Journal of Medical Chemistry, 2005; 48:4705, Neuropsychopharmacology, 2000;22:451)。バレニクリンによる情動障害改善効果を示唆するこれらの報告を考えれば、その有害作用を神経直接作用だけに限局して捉えることは困難である。それではバレニクリンの中枢性

有害作用はどのように惹起されるのだろうか？本申請者は、この中枢性有害作用には、バレニクリンの神経直接作用以外に、神経と協働する血液脳関門 (BBB) 構成細胞が関与すると考え、その作用標的として「脳神経血管機構」に着目した。この機構 (neurovascular unit) は、脳神経細胞と BBB 構成細胞 (脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト) から成る。後者は、循環血液と脳実質を隔てる「関門」を構築し、神経細胞と協働して脳機能を担う (Neuron, 2008; 57: 178)。BBB 機能障害は、抑うつ・自殺念慮などの情動障害の重篤度と相関し (PLoS One 2010;e11089)、また、喫煙が疾患悪化のリスクとなる糖尿病・動脈硬化・COPD などの「喫煙リスク疾患」においても BBB の脆弱化が認められる。本申請者は、BBB 機構を支えるペリサイトがバレニクリンの標的受容体 nAChR $\alpha 4$ サブユニットを極めて大量に発現することを突き止めた。本研究では、BBB 機構を構成するペリサイトを「バレニクリン副作用感受性細胞」として捉え、喫煙リスク疾患の BBB 脆弱性を背景としたバレニクリンによる本機構の破綻が中枢性有害作用発現へと誘導する可能性を追究する。

2. 研究の目的

本研究では、ペリサイトを「バレニクリン副作用感受性細胞」として捉え、バレニクリンにより微小な BBB 障害が生じ、これを契機に血液由来毒性因子の流入・脳神経血管機構障害が段階的に進展し、中枢性有害作用が発現するとの仮説を提起した。そこで、脳血管内皮細胞を標的としたバレニクリンによる BBB 機能変化、バレニクリンによるペリサイトの BBB 機能修飾作用の変化、について検討することを企てた。すなわち、本研究ではバレニクリンの標的受容体である $\alpha 7$ nAChR、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR それぞれについて脳血管内皮細胞及びペリサイトにおける役割を明らかにし、バレニクリンによる BBB 機能障害を契機とした脳神経血管機構の破綻が中枢性有害作用発現へと導く可能性とその責任受容体を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 初代培養 BBB 細胞の nAChR サブユニット発現量変動: 脳血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトはそれぞれ 3 週齢及び生後 1-2 日の wistar rat から単離培養した。これらを用いて各細胞における nAChR サブユニット($\alpha 4$, $\beta 2$, $\alpha 7$) 発現量を western blot 法で測定した。

(2) 脳血管内皮細胞に対する nAChR アゴニストの作用: 初代培養により脳血管内皮細胞を単離培養後、24 transwell plate(Corning)を用いて in vitro BBB モデルを作製した。このモデルを用いて、経内皮電気抵抗値 (TEER) 及び Na-F (sodium fluorescein)、EBA (evans blue-albumin) の透過係数、脳血管内皮細胞に発現する密着結合構成蛋白質 (ZO-1、occludin、claudin-5) の発現量を指標として脳血管内皮細胞の $\alpha 7$ および $\alpha 4\beta 2$ nAChR を介した刺激が BBB 機能に及ぼす影響を検討した。

(3) ペリサイトに対する nAChR アゴニストの作用: ペリサイトに $\alpha 7$ および $\alpha 4\beta 2$ nAChR 選択的アゴニストをそれぞれ負荷し、24 時間後に培養上清中に存在する血液脳関門障害因子である基底膜分解酵素 MMP-9 量を指標として各 nAChR の役割を検討した。また、炎症性サイトカインである TNF- α と各 nAChR アゴニストを同時に処理し、TNF- α 誘発性 MMP-9 産生量の変化を指標として炎症病態下における nAChR の役割を評価した。

(4) 正常マウスにおけるバレニクリンの BBB に対する作用: 正常動物に [14 C]イヌリン(血液脳関門非透過性マーカー)および [3 H]CsA(P-糖タンパク質基質)をバレニクリンと同時に静脈内投与し、30 分後のイヌリン及びシクロスポリン(CsA)の脳/血清比を測定し、BBB におけるタイトジャンクション及び P-糖タンパク質の機能を評価した。

4. 研究成果

(1) BBB 構成細胞間の nAChR 発現量の差異: BBB 機構を構成する脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトにはバレニクリン標的受容体である $\alpha 4$, $\beta 2$, $\alpha 7$ の各 nAChR サブユニットの発現が認められた。特にペリサイトは

他の BBB 構成細胞と比べて $\alpha 4$ および $\beta 2$ サブユニットが多く発現していた。従って、脳血管構成細胞にはバレニクリン標的受容体である $\alpha 7$ nAChR、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR の両サブタイプが発現し、特に $\alpha 4\beta 2$ nAChR の発現はペリサイトで最も高かった。以上より、BBB 構成細胞の中ではペリサイトが、バレニクリンに対して高感受性である可能性が示唆された。

(2) nAChR アゴニストによる脳血管内皮細胞透過性の変化:

脳血管内皮細胞に $\alpha 7$ nAChR 選択的アゴニスト PHA543613 を 24 時間処理すると、TEER 値の上昇及び Na-F、EBA 透過係数の低下が認められた。また、脳血管内皮細胞の $\alpha 7$ nAChR 及び claudin-5 発現量は増加した。従って、バリア機能の亢進にはこれらの発現量増加が関与していることが示唆された。一方、96 時間後では TEER の低下及び Na-F、EBA 透過係数の上昇が認められた。24 時間後と比較して密着結合タンパク質の発現量は変化していなかったが、 $\alpha 7$ nAChR は減少していた。従って、 $\alpha 7$ nAChR の短時間刺激は BBB 機能を亢進するが、長時間刺激は $\alpha 7$ nAChR のダウンレギュレーションを惹き起こし BBB 機能亢進作用の消失さらには BBB 機能低下へと導くことが考えられる。

一方、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 選択的アゴニスト 5-iodo-A85380 は、TEER 値及び Na-F、EBA 透過係数、密着結合タンパク質の発現量を変化させなかった。

これらの結果から、バレニクリン標的受容体のなかで $\alpha 7$ nAChR は脳血管内皮細胞のバリア機能を亢進させるが、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR はこの作用には関与しないことが判った。従って、バレニクリンは $\alpha 7$ nAChR サブタイプを介して BBB 機能を修飾する可能性が考えられる。

(3) ペリサイトに対する nAChR アゴニストの作用:

nAChR の BBB 障害因子 MMP-9 産生への影響: $\alpha 7$ nAChR アゴニスト PHA543613 に応答しペリサイトは MMP-9 を産生したが、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR アゴニスト 5-iodo-A85380 によるペリサイトの MMP-9 産生は認められなかった。従って、バレニクリンの標的受容体である $\alpha 7$ nAChR を介した刺激は、ペリサイトの

MMP-9 の産生を亢進させ、血液脳関門障害を誘発する可能性が示唆される。

TNF- α 誘発性 MMP-9 産生に対する *nAChR* の作用：我々は血液脳関門構成細胞においてペリサイトが最も炎症性サイトカイン *TNF- α* に高感受性であり、*TNF- α* の刺激により他の細胞に比べて多くの MMP-9 を産生することをすでに明らかにしている。このペリサイトによる *TNF- α* 誘発性 MMP-9 産生に対する各 *nAChR* サブタイプの関与を検討した。 $\alpha 7$ *nAChR* アゴニストは p38 MAPK 活性化を増幅して *TNF- α* 誘発性 MMP-9 産生に対して促進的に働くが、 $\alpha 4\beta 2$ *nAChR* アゴニストは Akt 活性化を阻害し抑制的に働くことが明らかになった。この $\alpha 4\beta 2$ *nAChR* アゴニストによる MMP-9 産生の抑制には *TNF* 受容体の発現抑制も関与していた。

(4) 脳血管内皮細胞/ペリサイト共培養 BBB モデルに対する $\alpha 7$ *nAChR* アゴニストの作用:

ペリサイト共存下で $\alpha 7$ *nAChR* アゴニスト PHA543613 を脳血管内皮細胞に長時間処理すると、脳血管内皮細胞単独培養時よりも Na-F 透過性の上昇が認められた。ペリサイトは MMP-9 産生および脳血管内皮細胞 $\alpha 7$ *nAChR* のダウンレギュレーションを促進し、 $\alpha 7$ *nAChR* を介したバリア機能低下を増悪させる可能性がある。

(5) 正常マウスにおけるバレニクリンの BBB 機能に対する作用:

バレニクリンを正常マウスに単回投与すると、 $[^{14}\text{C}]$ イヌリンの脳/血清比に対して影響を与えず、 $[^3\text{H}]$ CsA の脳/血清比を増加させた。従って、バレニクリンは常態下における BBB の密着結合能に対して影響を及ぼさないが、P-糖タンパク質の排出機能を阻害することが判った。P-gp の基質となる血液由来毒性因子がバレニクリン投与によって脳実質内へ移行し、中枢性有害作用発現を誘発する可能性が示唆される。一方、バレニクリンは密着結合能に影響を与えなかったが、炎症性メディエーターが増加する COPD などの喫煙リスク疾患におけるバレニクリンの影響は不明である。バレニクリン暴露時間の問題も含めた病態依存的な作用などの検討がさらに必要で

ある。

本研究成績は、BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞及びペリサイトの $\alpha 7$ *nAChR* 刺激が BBB 機能障害に関与することを明らかにし、バレニクリンが $\alpha 7$ *nAChR* を介して BBB 機能障害を惹き起こす可能性を示唆するものであった。バレニクリン誘発性 BBB 機能障害発現機序を解明する上で、神経細胞やミクログリアの BBB 機能への影響や BBB の $\alpha 7$ *nAChR* 優位となる病態等を明らかにすることが必要である。以上、本研究はバレニクリンによる BBB 機能障害発現の標的受容体として $\alpha 7$ *nAChR* を提示した点で意義深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件 主要なもののみ記載)

Takata F, Tominaga K, Koga M, Dohgu S, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y. Elevated permeability of the blood-brain barrier in mice intratracheally administered porcine pancreatic elastase. 査読有 J Pharmacol Sci. 2015 Sep;129(1):78-81. doi: 10.1016/j.jphs.2015.08.008.

Dohgu S, Takata F, Kataoka Y. Brain pericytes regulate the blood-brain barrier function. 査読無 Nihon Yakurigaku Zasshi. 2015 Jul;146(1):63-5. doi: 10.1254/fpj.146.63

Machida T, Takata F, Matsumoto J, Takenoshita H, Kimura I, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Brain pericytes are the most thrombin-sensitive matrix metalloproteinase-9-releasing cell type constituting the blood-brain barrier in vitro. 査読有 Neurosci Lett. 2015 Jul 10;599:109-14. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.028.

Takahashi H, Takata F, Matsumoto J, Machida T, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Brain pericyte-derived soluble factors

enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. 査読有 Biochem Biophys Res Commun., 457, 532-7 (2015). doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.016.

Yasutaka Y, Watanabe T, Nakashima A, Matsumoto J, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y. Tumor necrosis factor- α reduces beta-amyloid accumulation primarily by lowering cellular prion protein levels in a brain endothelial cell line. 査読有 FEBS Lett., 589:263-8 (2015). doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.007.

Tóth AE, Tóth A, Walter FR, Kiss L, Veszeka S, Ózsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA. Compounds blocking methylglyoxal-induced protein modification and brain endothelial injury. 査読有 Arch Med Res., 45, 753-64 (2014). doi: 10.1016/j.arcmed.2014.10.009.

Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszeka S, Nagy L, Puskás LG, Couraud PO, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA. Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. 査読有 PLoS One, 9(7):e100152 (2014)

Matsumoto J, Takata F, Machida T, Takahashi H, Soejima Y, Funakoshi M, Futagami K, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. 査読有 Neurosci Lett., 578:133-8 (2014)

〔学会発表〕(計 18 件 主要なもののみ記載)

木村郁哉, 道具伸也, 高田芙友子, 松本純一, 川原庸平, 山内淳史, 片岡泰文
 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体による BBB 機能の亢進
第 136 回日本薬学会年会
2016 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜
金岡祐輝, 古賀允久, 山内淳史, 片岡泰文

バレニクリンはマクロファージにおける酸化 LDL による泡沫化を促進する
第 136 回日本薬学会年会

2016 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜
道具伸也, 町田 崇, 高田芙友子, 木村郁哉, 松本純一, 山内淳史, 片岡泰文
脳ペリサイトの PAR1-PKC δ/θ シグナルはトロンピン誘発性 MMP-9 産生及び血液脳関門障害に關与する

第 89 回日本薬理学会年会 2016 3 月 9-11 日, パシフィコ横浜

古瀬由奈, 道具伸也, 高田芙友子, 松本純一, 木村郁哉, 吉田 愛, 有留尚孝, 岩尾悠可, 納富 夕, 山内淳史, 片岡泰文

IL-1 β および TNF- α による血液脳関門機能障害における細胞内情報伝達機構
第 68 回日本薬理学会西南部会 2015 11 月 21 日, 下関

江島優佳, 古賀允久, 金岡祐輝, 久永真美, 田代哲士, 橋爪 渚, 山内淳史, 片岡泰文

血管内皮細胞における禁煙補助薬バレニクリンの遊走作

第 68 回日本薬理学会西南部会 2015 11 月 21 日, 下関

高田芙友子, 松本純一, 道具伸也, 町田崇, 山内淳史, 片岡泰文

脳ペリサイトは TNF- α に応答してミクログリアを活性化させる

第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日 名古屋国際会議場

松本純一, 道具伸也, 高田芙友子, 町田崇, 二神幸次郎, 山内淳史, 片岡泰文
脳ペリサイトは TNF- α に応答してグリア細胞より多量の IL-6 を遊離する - 脳ペリサイトの IL-6 産生における細胞内シグナル経路の役割 -

第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 20 日 名古屋国際会議場

町田崇, 道具伸也, 高田芙友子, 松本純一, 平田亮介, 宮村知幸, 山内淳史, 片岡泰文

糖尿病による BBB 機能不全におけるトロンピン反応性脳ペリサイトの役割

第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月
20 日 名古屋国際会議場

金岡祐輝、古賀允久、大石かおる、杉山
慶太、江島優佳、久永真未、山内淳史、
片岡泰文

バレニクリンによる $\alpha 7nAChR$ を介する
動脈硬化巣形成の増悪作用

第 135 回日本薬学会年会 2015 年 3 月
神戸

高田英友子、道具伸也、松本純一、町田
崇、山内淳史、片岡泰文

AMPK 活性化を介したメトホルミンの
血液脳関門機能強化作用

第 3 回日本くすりと糖尿病学会学術集会
2014 年 11 月 2 日 アクロス福岡

金岡祐輝、古賀允久、大石かおる、杉山
慶太、江島優佳、久永真未、山内淳史、
片岡泰文

禁煙補助薬バレニクリンによる心血管
系有害辞事象

第 67 回日本薬理学会西南部会 2014 年
11 月 産業医科大学

木村郁哉、道具伸也、高田英友子、松本
純一、町田崇、山内淳史、片岡泰文

脳ペリサイトにおけるニコチン性アセ
チルコリン受容体による TNF- α 誘発性
MMP-9 の修飾

第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月
21 日 仙台国際センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

片岡 泰文 (KATAOKA, Yasufumi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：70136513

(2)研究分担者

道具 伸也 (DOHGU, Shinya)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：60399186

高田 英友子 (TAKATA, Fuyuko)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：70412575

(3)連携研究者

なし