

短 報

デキストラン硫酸ナトリウム誘発性腸炎マウスモデルにおける varenicline の改善効果

末丸 克矢*, 大山 裕紀子, 阿藤 寛明, 渡辺 雅彦
就実大学薬学部公衆衛生学研究室

Ameliorating effect of varenicline on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

Katsuya Suemaru*, Yukiko Ohyama, Hiroaki Aso, Masahiko Watanabe
Laboratory of Public Health, School of Pharmacy, Shujitsu University

(Received 7 October 2015; accepted 6 November 2015)

Abstract : The cholinergic anti-inflammatory system via $\alpha 7$ nicotinic receptors ($\alpha 7$ nAChRs) in macrophages have been proposed to play a role in neuroimmunomodulation for ulcerative colitis. Varenicline is clinically approved for smoking cessation and it is a partial $\alpha 4\beta 2$ and full $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist in vitro studies. In the present study, we investigated the effect of varenicline in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mice model. Daily treatment of varenicline (1 and 3 mg/kg, i.p.) dose-dependently attenuated the disease activity index and shortening of colon length induced by 4% DSS. In the histological study of hematoxylin-eosin staining, crypt loss and leukocyte infiltration were observed in DSS-treated mice compared with control mice, and these phenotypes were improved by varenicline administration. These findings suggested that varenicline has an ameliorating effect on DSS-induced colitis in mice.

Keywords: Varenicline; Colitis; Cholinergic; Anti-inflammatory; $\alpha 7$ nACh receptor

緒言

潰瘍性大腸炎は大腸の粘膜にびらんや潰瘍ができる炎症性疾患で、難病に指定されている。国内患者数は毎年増加し、平成 25 年度末では 16 万人を超えた。症状は下痢や粘血便で、再燃・寛解を繰り返し、完治や再燃、難治化を抑える確実な

治療法がないのが現状である。潰瘍性大腸炎治療の基本方針は、難治性潰瘍性大腸炎（ステロイド依存性またはステロイド抵抗性）に陥らせないように炎症をコントロールすることで、5-アミノサリチル酸製剤で寛解状態をできるだけ長期間維持することとされている¹⁾。従って、作用機序

の異なった新規抗炎症薬の開発が期待される。

潰瘍性大腸炎を対象とした臨床研究において、ニコチンの注腸やパッチが有効であることが報告されている^{2,3,4}。その作用機序として、 $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) がマクロファージ上に存在し、抗炎症作用を惹起していると推察されている^{5,6,7}。しかし、ニコチンはその副作用の問題点から臨床応用はなされていない。一方、禁煙補助薬の varenicline は $\alpha 4\beta 2$ 型 nAChR の部分作動薬であるが、 $\alpha 7$ 型 nAChR の完全作動薬でもある⁸。従って、varenicline が潰瘍性大腸炎において抗炎症薬作用を有することが推察される。

新規治療薬の開発には、疾患動物モデルを用いた薬効評価が重要となる。潰瘍性大腸炎治療薬の薬効評価に繁用されるモデルとしては、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いた実験動物モデルがある。このモデルでは、ラットやマウスに DSS 溶液を飲水させることで、大腸に局限した炎症を誘発することが可能で、その病態はヒトにおける潰瘍性大腸炎に類似している。そこで、本研究では、DSS によって誘発される大腸炎動物モデルを用いて varenicline の効果を検討した。

方法

実験動物：実験には、ICR 系雄性マウスを用いた。動物は、室温 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ の動物飼育室にて、おがくずを敷いたプラスチックケージ内で飼育した。本実験は、就実大学研究倫理安全委員会の承認を得た後に行った。

実験試薬：デキストラン硫酸ナトリウム (DSS：和光純薬) は水道水で 4% に溶解した。Varenicline tartrate (Sigma) は生理食塩水に溶解した。

実験手続き：実験には、varenicline (1 および 3 mg/kg) を 5 日間連日腹腔内に投与した群と生理食塩水を腹腔内投与した control 群を設けた。各群には、6 日間 4% DSS を自由飲水させた。無処置の naive 群には、水道水を自由飲水させた。腸炎は、Disease Activity Index および大腸の腸管長

の測定により評価した。また、Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色により組織学的評価を行った。

Disease Activity Index：腸炎の程度は、下痢と血便の程度を 3 段階に分類して評価した。下痢は、普通便：Score 0、ピンセットで掴むと便が崩れてしまう下痢便：Score 1、ピンセットで掴むことができない激しい下痢便：Score 2 とした。血便は、出血の全くない普通便：Score 0、便の表面のみに出血が見られる出血便：Score 1、便の表面と内部の両方に出血が見られる出血便：Score 2 とした。Disease Activity Index は、下痢と血便の合計 Score (0~4) とした。

大腸の長さの測定：DSS 大腸炎動物モデルでは、炎症が増悪すると腸管長の短縮が認められる。腸管長の短縮の程度は、実験 6 日目に大腸を摘出し、その腸管長を測定した。

H&E 染色による組織学的評価：実験 6 日目にネブタール (500 mg/kg, i.p.) の深麻酔下で開腹し、10 N マイルドホルムにて灌流固定を行った。大腸を肛門側から 3 cm 程度切り出し、パラフィン包埋切片とした後、H&E 染色組織標本作製し、光学顕微鏡下で観察を行った。

統計学的検討：測定値は、いずれも平均値 ± 標準誤差で示した。Disease Activity Index (score) の統計処理には、Steel-Dwass test を用いた。腸管長の比較は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Dunnett test を用いて統計解析を行った。有意水準 (p 値) は、 $p < 0.05$ とした。

結果

4% DSS の飲水に伴って、Disease Activity Index が増悪した。その作用は varenicline (1 および 3 mg/kg, i.p.) の連日投与により、用量依存的に抑制された。しかし、その効果は 6 日目では減弱が認められた。

実験 6 日目に大腸の長さを測定した結果、4% DSS 飲水マウスに saline を投与した群の腸管長は、DSS を飲水させていない naive 群と比較して有意 ($p < 0.01$) に短縮した。その作用は、

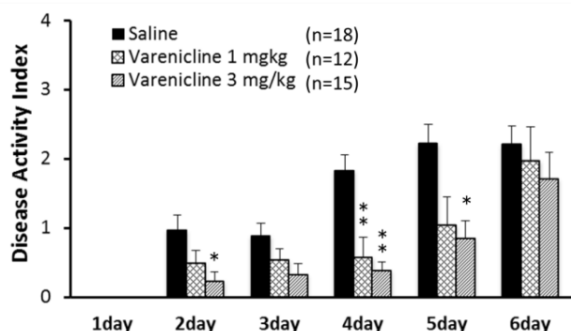


図 1. DSS 誘発大腸炎 (Disease Activity Index) に対する varenicline の効果
*p < 0.05, **p < 0.01 versus saline control (Steel-Dwass test)

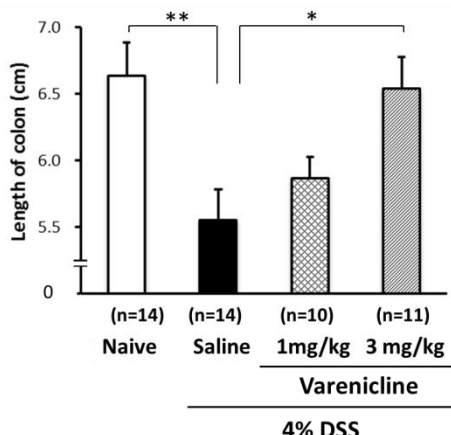


図 2. DSS 誘発大腸炎 (腸管長の短縮) に対する varenicline の効果
*p < 0.05, **p < 0.01 versus saline control (one-way ANOVA and Dunnett test)

varenicline (1 および 3 mg/kg)によって用量依存的に抑制され, varenicline 3 mg/kg では有意 (p<0.05)な差が認められた. 図 3 に naive 群, 4%DSS+saline 群および 4%DSS+varenicline (3 mg/kg, i.p.) 群における代表的な H&E 染色

組織像を示す. Naive 群の組織像では, 陰窩の配列の異常あるいは密度の減少は認められず, 炎症細胞の浸潤も認められなかった. 4%DSS+saline 群の組織像には, 陰窩の構造の異常が認められた. また, 杯細胞の減少あるいは異常が認められ, 粘膜固有層に好酸球, 好中球と見られる細胞が認められた. 4%DSS+varenicline 3 mg/kg 群の組織像では, 4%DSS+saline 群と比較して, 陰窩の構造の異常あるいは密度の減少は軽度であり, 明らかな炎症細胞の浸潤は認められなかった.

考察

喫煙は胃潰瘍などの消化器系疾患に対して明らかな危険因子であるが, 潰瘍性大腸炎に対しては, その様相が異なる. すなわち, 潰瘍性大腸炎の有病率が喫煙者で低いこと²⁾ならびに喫煙習慣を有する潰瘍性大腸炎患者では禁煙により病態が増悪することが報告されている⁹⁾. また, 潰瘍性大腸炎を対象とした臨床研究において, ニコチンの注腸やパッチが有効であることが報告され^{2,3,4)}, 潰瘍性大腸炎の病態にニコチン受容体が関連することが推察されていた. 近年, 神経系による炎症制御が明らかになり, 迷走神経による炎症反応の制御が潰瘍性大腸炎の病態に関与することが明らかになってきた. すなわち, 迷走神経刺激によりマクロファージに発現する α 7nAChR が, 細胞内シグナル伝達において Jak-2 を介して STAT3 経路のリン酸化を促し, 最終

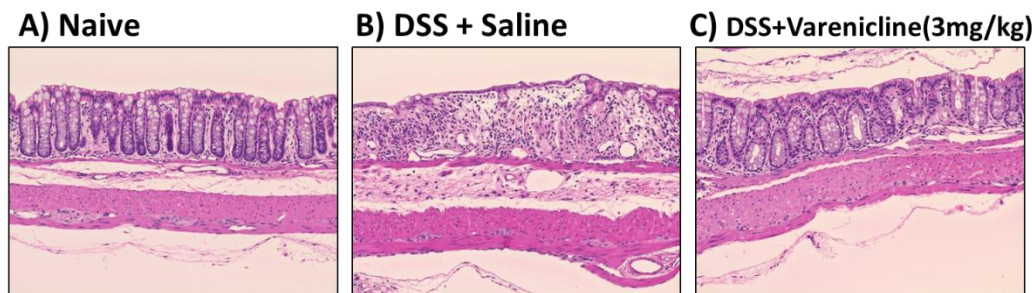


図 3. H&E 染色による大腸粘膜の組織学的評価 (20 倍像)
A) 無処理(naive)群 (Disease Activity Index score 0)
B) 4%DSS+Saline 群 (Disease Activity Index score 4)
C) 4%DSS+Varenicline (3mg/kg)群 (Disease Activity Index score 0.5)

的には NF- κ B を阻害することによって炎症性サイトカインの産生を抑制している^{5,6,7)}.

我々も、DSS 大腸炎モデルにおいて大腸粘膜層に多数のマクロファージの浸潤が観察され、その多くに $\alpha 7$ nAChR の発現を確認している¹⁰⁾。さらに、選択的 $\alpha 7$ nAChR 作動薬の PNU282987¹¹⁾が DSS 大腸炎を抑制し¹⁰⁾、その作用は $\alpha 7$ nAChR 阻害薬の MLA¹¹⁾の併用により効果が消失したことを見出した¹⁰⁾。これらの結果は、 $\alpha 7$ nAChR 作動薬が潰瘍性大腸炎治療薬として有用である可能性を示唆している。

本研究では、禁煙補助薬の varenicline が $\alpha 4\beta 2$ nAChR の部分作動薬であるとともに $\alpha 7$ nAChR の完全作動薬であることに着目し⁸⁾、DSS 大腸炎動物モデルに対する効果を検討した。その結果、varenicline は Disease Activity Index と腸管長の短縮を抑制し、H&E 染色組織像においてもその効果が確認された。しかし、varenicline 投与 6 日目の腸管長の短縮は顕著に抑制されていたが、Disease Activity Index を指標にした場合その効果は減弱していた。DSS 大腸炎動物モデルにおける薬効評価の指標として、大腸組織中の myeloperoxidase (MPO) 活性やサイトカインの測定が汎用される。我々の検討においても、DSS 大腸炎動物モデルにおいて、IL-6、IFN- γ 、ならびに MPO 活性が顕著に上昇することを確認している¹⁰⁾。今後、varenicline の効果を明らかにするには、マクロファージの浸潤や各種炎症マーカーを指標とした検討が必要と考えられる。

以上、本研究により DSS 大腸炎動物モデルにおいて varenicline が改善効果を示すことが明らかになった。

謝辞

組織学的評価についてご指導いただきました洲崎悦子先生に感謝申し上げます。

引用文献

1) NPO 法人日本炎症性腸疾患協会:潰瘍性大腸

炎の診療ガイド第2版, 文光堂, 2011.

- 2) Harries AD, et al.: Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J* 284:706 (1982).
- 3) Sandborn WJ, et al.: Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 126:364-371(1997).
- 4) Guslandi M, Tittobello A.: Outcome of ulcerative colitis after treatment with transdermal nicotine. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 10:513-515 (1998).
- 5) Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al.: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405, 458-462 (2000).
- 6) Wang H, Yu M, Ochani M, et al.: Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 421:384-388 22 (2003).
- 7) Rosas-Ballina M, et al.: Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*, 334, 98-101 (2011).
- 8) Mihalak KB, Carroll FI, Luetje CW.: Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol.* 70:801-805 (2006).
- 9) Osborne MJ, Stansby GP.: Cigarette smoking and its relationship to inflammatory bowel disease. *J R Soc Med.* 85:214-216 (1992).
- 10) Tasaka Y, Suemaru K, Araki H, et al.: Involvement of stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the suppressive effect of tropisetron on DSS-induced colitis in mice. *J Pharmacol Sci.* 127:275-283 (2015).
- 11) Leite PE, et al.: Selective activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR $\alpha 7$) inhibits muscular degeneration in mdx dystrophic mice. *Brain Res.* 1573:27-36 (2014).