

○ 総 説

フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症増悪の有害作用

稲田 紘舜

福岡大学薬学部生物薬剤学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

**Adverse effects of fluoroquinolone antibiotics on onset and exacerbation
of aortic aneurysm and dissection****Koshun INADA**Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan**Abstract**

Fluoroquinolone antibiotics are among the most commonly prescribed. However, the use of fluoroquinolones increases the risk of aortic aneurysm and dissection (AAD). In this study, we attempted to elucidate the pathogenesis of AAD induced by fluoroquinolone antibiotics.

We examined effects of the fluoroquinolone moxifloxacin (MFLX) on the occurrence of AAD in a moderate-severity mouse model. MFLX ($100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) induced AAD in mice with moderate-severity AAD. In addition, aortic dilatation, destruction, and elastic fiber fragmentation were observed in abdominal aorta in MFLX (30 and $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$)-treated moderate AAD model mice. Also, MFLX significantly increased OPN expression in aortic tissues in mice with AAD. Next, we examined effects of MFLX on the expression of OPN protein in RAW 264.7 cells. MFLX significantly increased expression of OPN protein through phosphorylation of ERK 1/2 and JNK in RAW 264.7 cells.

Phenotype switching is involved in the onset and exacerbation of AAD. Therefore, we examined effects of three fluoroquinolone antibiotics, MFLX, ciprofloxacin (CPFX), and levofloxacin (LVFX), on the expression of the vascular smooth muscle cell contractile phenotype markers in RASMCs. CPFX and MFLX significantly decreased the expression of SM22 α , α -SMA, SMMHC, and caldesmon proteins in RASMCs compared with vehicle. On the other hand, LVFX significantly decreased the expression of SM22 α , SMMHC, and caldesmon proteins in RASMCs compared with vehicle, but did not significantly decrease the expression of α -SMA protein. Furthermore, CPFX and MFLX significantly decreased the expression of SM22 α , α -SMA, SMMHC, and caldesmon in mRNA levels in RASMCs compared with vehicle, but LVFX did not significantly decrease those of mRNA expression levels. Therefore, among the three drugs, MFLX and CPFX had a higher risk of developing and exacerbating AAD than LVFX.

In conclusion, fluoroquinolone antibiotics may cause on onset and exacerbation of AAD through upregulation of OPN expression and phenotype switching.

Keywords : Fluoroquinolone antibiotics, Aortic aneurysm and dissection, Osteopontin, phenotype switching

【緒言】

フルオロキノロン系抗菌薬は、最も一般的に処方されている抗菌薬であり、DNA ジャイレースの阻害やDNA トポイソメラーゼIVを阻害することで殺菌的に作用する。抗菌スペクトルが広域であるため、尿路感染症や呼吸器感染症をはじめとした多くの感染症に頻用されている。また、フルオロキノロン系抗菌薬の使用は心血管死亡リスクの増加と関連しており、モキシフロキサシン (moxifloxacin; MFLX) はそのリスクが最も高く、2～3倍に増加することが報告されている [1]。さらに、臨床研究やメタアナリシス研究においてフルオロキノロン系抗菌薬の服用により大動脈瘤・大動脈解離 (aortic aneurysm and dissection; AAD) のリスクが増大することが報告されている [2, 3]。なかでも MFLX, シプロフロキサシン (ciprofloxacin; CPMX) およびレボフロキサシン (levofloxacin; LVFX) の3剤はAADの有害作用と強く関連している [4]。さらに2019年1月10日に厚生労働省は全てのフルオロキノロン系抗菌薬の重大な副作用に「大動脈瘤、大動脈解離を引き起こすことがある」と追記するように製薬会社に添付文書の改訂を指示しており、大動脈瘤および大動脈解離を合併している患者を「慎重投与」の対象とした。

AAADは一般的に無症状で病状が進行し、破裂した場合の死亡率は非常に高い疾患であるため、早期発見が非常に重要である。また、腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm; AAA) は平均大動脈直径の50%を超える局所拡張した病態であり、血管径の拡大、血管中膜の脆弱化 (血管平滑筋細胞の減少、アポトーシスなど)、エラスチン分解及び中膜・外膜への炎症性細胞の浸潤が病理学的特徴である。さらに血管平滑筋細胞の収縮型から合成型への表現型スイッチはAAAの発症と増悪に重要であり [5]、この表現型スイッチは、血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー (α -smooth muscle actin; α -SMA, smooth muscle protein 22 α ; SM22 α , smooth muscle myosin heavy chain; SMMHC, and caldesmon など) の喪失で特徴づけられる。

オステオポンチン (osteopontin; OPN) はマクロファージ、血管平滑筋細胞などから分泌され、炎症に関与する糖リン酸化タンパク質である。また、AAAモデル動物のAAA病変において、増加したOPNはmatrix metalloproteinases発現を増加させ、細胞外基質を分解させることにより、AAAを発症・増悪させる [6]。

このように幅広い感染症に有効とされるフルオロキノロン系抗菌薬が頻用されているにも関わらず、重篤な有害作用である大動脈瘤・解離のリスクを上昇させることは、極めて問題である。しかし、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症機序は不明である。そこで本研究では、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症機序を解明し、フルオロキノロン系抗菌薬間でのリスクの相違を検討した。

第1章 第1節

中等度AADモデルマウスのAAD形成に対するMFLXの影響

【目的】

フルオロキノロン系抗菌薬の中でもMFLXはAADの有害作用 [4] および心血管死のリスク増大 [1] と強く関連していることが報告されている。しかし、その発症機序は不明である。そこで本研究では、中等度AADモデルマウスにおいてMFLX誘発のAAD形成におけるOPN発現を評価した。

【実験方法】

4週齢の雄性C57BL/6Jマウス (Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan) を使用した。4週齢時から高脂肪食 (1.25% cholesterol, 15% cacao butter, and 0.5% sodium cholate; F2HFD1; Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) の負荷を開始し、8週齢時に浸透圧ミニポンプ (Alzet model 2004; Durect, CA, USA) を皮下移植し、angiotensin IIを4週間持続注入することで中等度AADモデルマウスを作製した [7]。9週齢時よ

り水に溶解したMFLX (30 and 100 mg kg⁻¹ day⁻¹) を3週間連続で経口投与し、12週齢時に腹部大動脈を評価した。また、中等度AADモデルマウスの大動脈組織をHematoxylin and Eosin (H&E), elastica-van Gieson (EVG) 染色, 免疫組織化学染色およびwestern blot法により評価した。

【結果・考察】

中等度AADモデルマウスにおいてMFLX投与群 (100 mg kg⁻¹ day⁻¹) は、腹部大動脈にAADを誘発させた (Fig. 1A)。次にH&E染色およびEVG染色により組織学的に評価を行った。その結果、MFLXによる血管径の拡大 (Fig. 2B), 破壊及びエラスチンの分解が観察された (Fig. 2C)。

また、免疫化学組織染色およびウエスタンブロット法において、MFLX投与群 (30 and 100 mg kg⁻¹ day⁻¹) はvehicle群と比較して、大動脈組織中のOPN発現増加が免疫化学組織染色によって観察された (Fig.

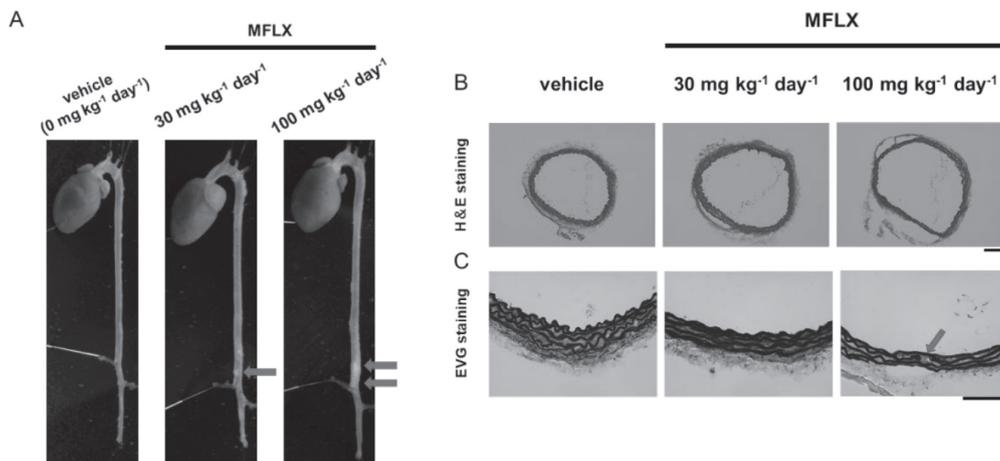


Fig. 1 Impact of MFLX on AAD occurrence in mice with moderate severity AAD.

Representative images of the aorta showing different features following administration of vehicle or MFLX (30 and 100 mg kg⁻¹ day⁻¹). The red arrow indicates AAD features (A). Representative images of Hematoxylin and eosin (H&E) stained-tissues shows aortic dilatation and destruction in treated-mice vs. control (B). Representative images of elastica van Gieson (EVG) staining showing differences in fragmentation of elastic fibers between treated- and control groups. The red arrow indicates fragmentation of elastic fibers in the aortic vessel wall (C). Scale bar: 100 μm.

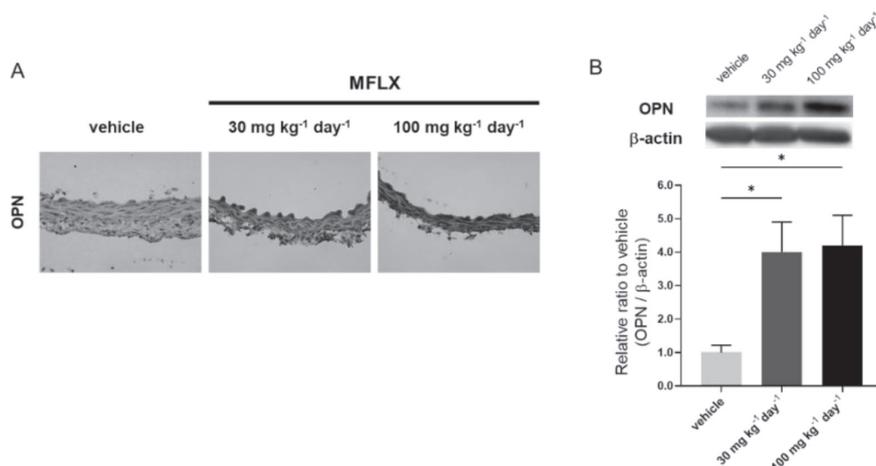


Fig. 2 Effects of MFLX on the expression of OPN in aorta.

Immunohistochemical staining shows the expression of OPN (A). Scale bar: 100 μm. Immunoblot analysis shows the levels of protein expression for OPN (B). Bars represent mean ± SD; *P < 0.05.

2A)。さらに、MFLX投与群 (30 and 100 mg kg⁻¹ day⁻¹) は vehicle 群と比較して大動脈組織における OPN タンパク発現を顕著に増加させた (Fig. 2B)。したがって、MFLXは大動脈組織における OPN 発現を増加させ、AADの発症を誘発する可能性が示唆された。

第1章 第2節

マクロファージにおける MFLX による OPN 発現変化とメカニズムの解明

【目的】

第1章 第1節より、MFLXが中等度AADモデルマウスの大動脈組織において OPN タンパク発現を増加させることによりAAD増悪を誘発させることが示唆された。しかし、MFLXによる OPN タンパク発現増加に関する機序は不明である。そこで、AADの誘発および増悪に重要な役割を果たしているマクロファージに着目し、マウスマクロファージ様細胞RAW 264.7における OPN 発現に対する MFLX の影響を検討した。

【実験方法】

マウスマクロファージ様細胞RAW 264.7を使用し、MFLXを300 μMで24時間処理し、western blot法により OPN のタンパク質量を測定した。

【結果・考察】

RAW 264.7細胞において MFLX は用量 (0 ~ 300 μM) および時間 (0 ~ 24 hours) 依存的に OPN タンパク発現を増加させ、300 μM, 24時間で最も増加させた。次に OPN 発現を調節する ERK 1/2 および JNK シグナルのリン酸化を評価した。その結果、MFLX は ERK 1/2 および JNK シグナルを1時間および8時間で顕著に活性化させた。さらに、MFLX と ERK 1/2 阻害剤である PD98059 (Fig. 3A) および JNK 阻害剤であ

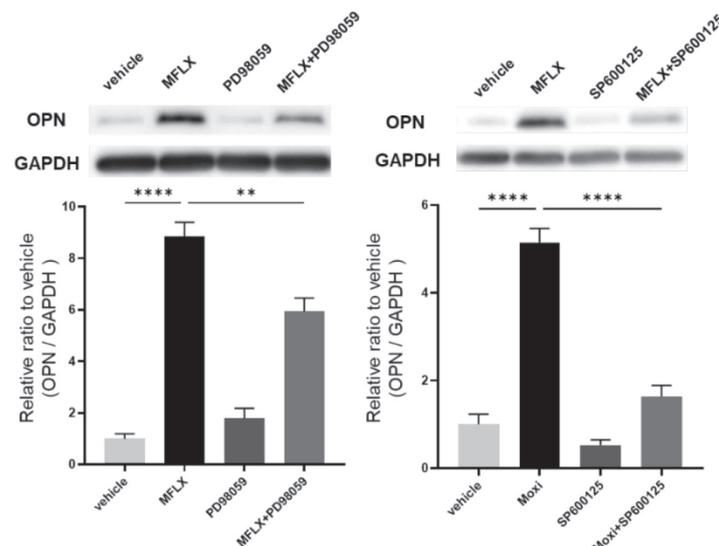


Fig. 3 Effect of ERK 1/2 inhibitor (PD98059) and JNK inhibitor (SP600125) on MFLX-increased expression of OPN protein levels in RAW 264.7 cells.

Representative immunoblots showing protein levels of OPN (upper panels). Quantitative analyses of band intensities showing expression of OPN protein (bottom panel). Cells were treated with vehicle or MFLX (300 μM) for 24 h in the absence or presence of the ERK 1/2 inhibitor (PD98059) (A) or the JNK inhibitor (SP600125) (B). PD98059 and SP600125 were added to cells for 30 min before treatment with vehicle or MFLX. Each bar represent mean ± SEM (n=4). **P<0.01, ****P<0.0001.

る SP600125 (Fig. 3B) の併用により, MFLX による OPN タンパク発現増加を抑制させた。したがって, MFLX はマクロファージにおいて ERK 1/2 および JNK シグナル経路を介して OPN タンパク発現を増加させることが示唆された。

第2章

フルオロキノロン系抗菌薬間における AAD リスクの相違

【目的】

CPFV, LVFX および MFLX の 3 剤間で AAD の発症および増悪のリスクの相違を評価するため, 血管平滑筋細胞における血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー (α -SMA, SM22 α , SMMHC, および caldesmon) の発現を比較・検討した。

【実験方法】

ラット大動脈血管平滑筋細胞 (rat aortic smooth muscle cells; RASMCs) を使用し, CPFV, LVFX および MFLX を 300 μ M で 96 時間処理し, RT-PCR 法および western blot 法により α -SMA, SM22 α , SMMHC および caldesmon の mRNA 量およびタンパク質量を測定した。

【結果・考察】

RASMCs において CPFV, LVFX および MFLX は 300 μ M, 96 時間処理により SM22 α , SMMHC および caldesmon のタンパク発現を顕著に減少させた。一方, CPFV および MFLX は vehicle と比較して α -SMA のタンパク発現を減少させたが, LVFX は減少させなかった (Fig. 4)。また, RASMCs において CPFV および MFLX (300 μ M, 96 時間) は vehicle と比較して SM22 α , α -SMA, SMMHC および caldesmon の mRNA 発現を減少させた。しかし, LVFX は, これらの mRNA 発現を減少させなかった。したがって, RASMCs において CPFV, LVFX および MFLX は血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー発現を減少させたことから, 血管中膜を脆弱化させることにより, AAD を誘発および増悪させる可能性が示唆された。さらに LVFX は CPFV および MFLX と同程度に血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー発現を減少させなかったため, 3 剤

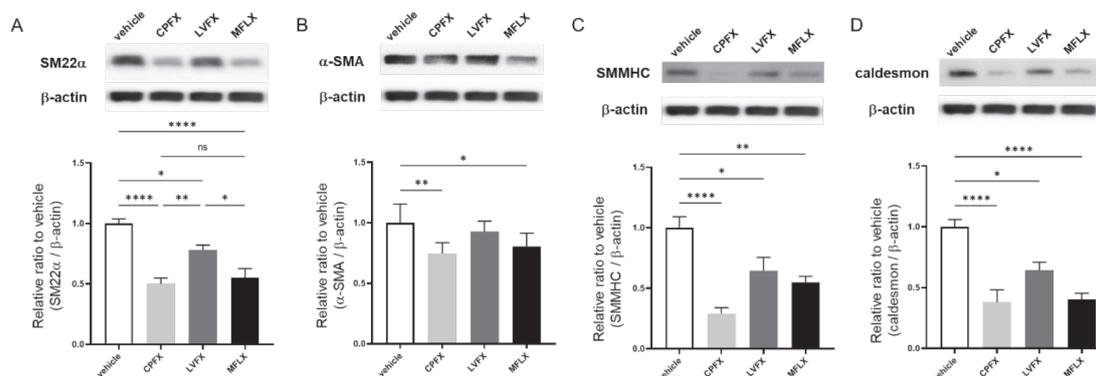


Fig. 4 Effect of treatment with CPFV, LVFX, and MFLX (300 μ M) for 96 h on the expression of marker of the VSMCs contractile phenotype protein in RASMCs.

Representative bands of SM22 α (A), α -SMA (B), SMMHC (C) and caldesmon (D) in CPFV, LVFX and MFLX treated RASMCs (upper panel). Quantitative analysis of band intensities showing expression of SM22 α (A), α -SMA (B), SMMHC (C) and caldesmon (D) proteins (bottom panel). Cells were treated with CPFV, LVFX and MFLX (300 μ M) for 96 h. Each bar represent mean \pm SEM (n=7-9). *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001.

の中ではLVFXがAADを誘発および増悪させるリスクが低い可能性が示唆された。

【総括】

本研究により、フルオロキノロン系抗菌薬はOPN発現増加および表現型スイッチを介してAADを発症・誘発させる可能性が示唆された。さらに3剤の中ではLVFXがAADを発症・増悪のリスクが低い可能性が示唆された。

本研究の成果より、フルオロキノロン系抗菌薬の有害作用に関する予測・軽減・回避対策の構築が可能となり、本薬物の安全性と有効性のさらなる向上が期待できる。さらにはAAD患者及びAAD発症リスクの高い患者において、フルオロキノロン系抗菌薬の使用を避け、その他の抗菌薬の使用を選択することが可能となる。フルオロキノロン系抗菌薬を使用しなければいけない場合は、治療上の有益性を考慮した上でリスクの低いLVFXを選択するなど、患者背景に沿って慎重に選択すべきである。

【参考文献】

- [1] E. Gorelik, R. Masarwa, A. Perlman, V. Rotshild, M. Abbasi, M. Muszkat, I. Matok, Fluoroquinolones and Cardiovascular Risk: A Systematic Review, Meta-analysis and Network Meta-analysis, *Drug Saf* 42 (2019) 529-538.
- [2] C.C. Lee, M.T. Lee, Y.S. Chen, S.H. Lee, Y.S. Chen, S.C. Chen, S.C. Chang, Risk of Aortic Dissection and Aortic Aneurysm in Patients Taking Oral Fluoroquinolone, *JAMA Intern Med* 175 (2015) 1839-1847.
- [3] S. Singh, A. Nautiyal, Aortic Dissection and Aortic Aneurysms Associated with Fluoroquinolones: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Am J Med* 130 (2017) 1449-1457.e1449.
- [4] A.C. Bennett, C.L. Bennett, B.J. Witherspoon, K.B. Knopf, An evaluation of reports of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin-association neuropsychiatric toxicities, long-term disability, and aortic aneurysms/dissections disseminated by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency, *Expert Opin Drug Saf* 18 (2019) 1055-1063.
- [5] H. Peng, K. Zhang, Z. Liu, Q. Xu, B. You, C. Li, J. Cao, H. Zhou, X. Li, J. Chen, G. Cheng, R. Shi, G. Zhang, VPO1 Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch by Activating Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK 1/2) in Abdominal Aortic Aneurysms, *J Am Heart Assoc* 7 (2018) e010069.
- [6] J. Li, X. Bao, Y. Li, Y. Wang, Z. Zhao, X. Jin, Study of the functional mechanisms of osteopontin and chemokine-like factor 1 in the development and progression of abdominal aortic aneurysms in rats, *Exp Ther Med* 12 (2016) 4007-4011.
- [7] S.A. LeMaire, L. Zhang, W. Luo, P. Ren, A.R. Azares, Y. Wang, C. Zhang, J.S. Coselli, Y.H. Shen, Effect of Ciprofloxacin on Susceptibility to Aortic Dissection and Rupture in Mice, *JAMA Surg* 153 (2018) e181804.